



**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-graduação em Genética e Bioquímica**

**Caracterização Molecular e Citogenética de
frutos de *Caryocar brasiliense* (Cambess) com e
sem espinho no caroço**

Luciana Nogueira Londe

**Uberlândia- MG
2010**



**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-graduação em Genética e Bioquímica**

**Caracterização Molecular e Citogenética de
frutos de *Caryocar brasiliense* (Cambess) com e
sem espinho no caroço**

Luciana Nogueira Londe

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti

Co-orientador: Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Genética e Bioquímica, área de concentração Genética.

**Uberlândia- MG
2010**



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-graduação em Genética e Bioquímica

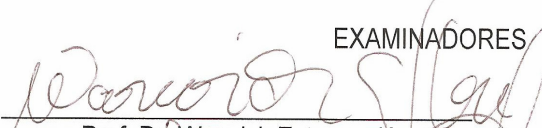
**Caracterização Molecular e Citogenética de
frutos de *Caryocar brasiliense* (Cambess) com e
sem espinho no caroço**

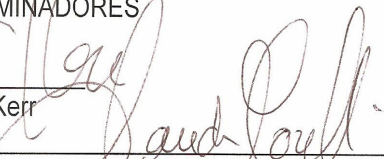
Luciana Nogueira Londe

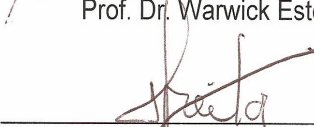
COMISSÃO EXAMINADORA

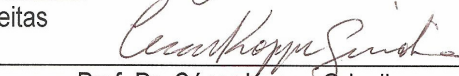
Presidente: Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Bonetti

EXAMINADORES


Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr

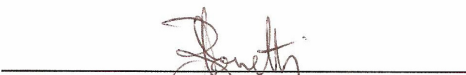

Prof.ª. Dr.ª. Sandra Morelli


Prof. Dr. Danival Vieira de Freitas


Prof. Dr. César Koppe Grisolia

Data da defesa: 23/02/2010

As sugestões da banca examinadora e as Normas da PGGB para o formato da
tese foram contempladas


Prof.ª. Dr.ª. Ana Maria Bonetti

Uberlândia, 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

L847c Londe, Luciana Nogueira, 1979-
Caracterização molecular e citogenética de frutos de
Caryocar brasiliense (Cambess) com e sem espinho no caroço
[manuscrito] / Luciana Nogueira Londe. - 2010.

156 f. : il.

Orientadora: Ana Maria Bonetti.

Co-orientador: Warwick Estevam Kerr.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,

Programa

de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Biologia molecular - Teses. 2. Pequi - Citogenética
- Teses. I. Bonetti, Ana Maria. II. Kerr, Warwick
Estevam. III. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Genética e
Bioquímica. IV. Título.

CDU:

577.2

ÍNDICE

Dedicatória	i
Agradecimentos	ii
Lista de figuras	iv
Capítulo I	iv
Capítulo II	v
Capítulo III	vi
Lista de tabelas	vii
Capítulo II	vii
Capítulo IV	viii
Apresentação	1
Capítulo I – Fundamentação teórica	2
O Cerrado	3
O Pequi, <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess. Caracterização botânica	4
Requerimentos ecológicos	5
Propagação	6
Perspectivas de melhoramento	11
Características químicas do fruto	13
Polpa e amêndoa	13
Carotenóides	14
Utilização e importância do pequi na alimentação e indústria	15
Madeira	17
Casca	18
Outros empregos do pequi e seu fruto	18
Pequi sem espinho	19
Biologia Molecular	20
Marcadores moleculares	20
Marcadores moleculares baseados em PCR – <i>Polymerase Chain Reaction</i>	22
Marcadores Moleculares RAPD – <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>	24

CAPÍTULO III - Estudo citogenético de <i>Caryocar brasiliense</i>	90
Cambess. (pequi) com e sem espinho no caroço	
Resumo	91
Abstract	92
Introdução	93
Material e Métodos	96
Material biológico	96
Preparação para análise convencional dos cromossomos	96
Bandeamento cromossômico	97
Região organizadora de nucléolo (NOR)	97
Coloração com fluorocromos CMA ₃ e DAPI	97
Coloração com Cromomicina (CMA ₃)	97
Coloração com DAPI	97
Bandeamento C – heterocromatina constitutiva	97
Análises ao microscópio	98
Resultados e Discussão	99
Conclusão	106
Referências bibliográficas	107
CAPÍTULO IV - Identificação de genes expressos no fruto do	112
pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Cambess.)	
Resumo	113
Abstract	114
Introdução	115
Material e Métodos	117
Área de coleta	117
Extração de RNA	117
Extração de RNA mensageiro	118

Construção da biblioteca de cDNA	118
Extração de plasmídeos	118
Reação de sequenciamento em microtubos	119
Análise da identidade em bancos genéticos	119
Resultados e Discussão	120
Conclusão	127
Conclusões gerais	128
Referências bibliográficas	130

Dedido essa conquista a todos que direta ou indiretamente dela participaram!

Agradecimentos

À Deus por me guiar pelos caminhos já percorridos e aqueles em que ainda caminharei.

À minha família: Anésio, Regina, Fernanda, Marcelo, Mariana e Eduardo. O amor, apoio e confiança que depositam em mim, me faz ser a pessoa que sou hoje.

À Tia Anna que durante os anos que morei em Uberlândia sempre esteve ao meu lado, me apoiando em palavras, ações e afeto.

Ao Gustavo, meu esposo, que me incentivou nas horas mais difíceis a continuar lutando.

A Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti pelo apoio, orientação e amizade em todos esses anos de trabalho.

Ao Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr pela co-orientação e apoio no desenvolvimento dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Veira Vieira pelo auxílio na condução dos experimentos e pela amizade.

À Ana Carolina, Mariana, Flávia, Isabel, Tininha pelo companheirismo na realização dos trabalhos.

Aos demais colegas do Laboratório de Genética que são grandes amigos.

À Luciana Oliveira e Betão por enviarem as folhas de pequi coletadas em Tocantins.

À CAPES pela concessão de Bolsa de Doutorado e pelo financiamento de material de consumo.

*Aos colegas pesquisadores da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais –
Unidade Regional Norte de Minas (EPAMIG/URENM) pelo apoio no término do
doutorado.*

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1: Regiões de Cerrado no Brasil (em verde) com ocorrência de *Caryocar brasiliense* Cambess. Fonte: www.unb.com.br **02**
- Figura 2: *Caryocar brasiliense* Cambess., árvore e fruto. (A) Planta adulta do pequi. (B) Detalhe do fruto (seta) Fonte: Kerr et al., 2007 **06**
- Figura 3: Comparação entre o pequi com espinho e o sem espinho no caroço. **Fonte:** Kerr *et al.* (2007) **17**
- A) Pequi com espinho no caroço. Fruto seccionado mostrando o endocarpo cheio de pequenos espinhos (seta).
- B) Pequi sem espinho no caroço. Fruto seccionado mostrando o caroço sem os espinhos (seta).

CAPÍTULO II

Figura 1: Regiões de Cerrado no Brasil (em verde) com ocorrência de *Caryocar brasiliense* Cambess. Fonte: www.unb.com.br **63**

Figure 2- Pequizeiro (*Caryocar brasiliense*). (A) Planta adulta B) Detalhe do fruto (seta). Fonte: Kerr et al., 2007. **64**

Figura 3: Comparação entre o pequi com espinho e o sem espinho no caroço. Fonte: Kerr et al. (2007) **65**

A) Pequi com espinho no caroço. Fruto seccionado mostrando o caroço cheio de pequenos espinhos (seta).

B) Pequi sem espinho no caroço. Fruto seccionado mostrando o caroço sem os espinhos (seta).

Figura 4: Produtos amplificados em pequi, *Caryocar brasiliense* Cambess., pelos primers de RAPD (OPA3, OPA2 e OPA7, respectivamente). a) 1- marcador (100 pb); 2 – população de Goiás; 3 – população de Minas Gerais; 4 – população de Porto Nacional; 5 – população de São José do Xingu (populações com espinho); 6 – indivíduo São José do Xingu (sem espinho) mostrando polimorfismo no pequi sem espinho (setas). b) Monomorfismo no pequi com espinho e ausência da banda detectada no pequi sem espinho (seta branca). Gel de agarose 2% corado com Brometo de etídeo. **72**

Figura 5 - Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e agrupamento pelo método de UPGMA entre 5 populações de pequi (*Caryocar brasiliense*) do cerrado brasileiro, utilizando 53 primers. **74**

Goiás: Corumbaíba – GO (Fazenda Arrependidos); Minas: Uberlândia – MG (Clube Itororó Caça e Pesca de Uberlândia); Tocant: Porto Nacional – TO; Xingu_CE: São José do Xingú - – MT (pequi com espinho no caroço); Xingu_SE: São José do Xingu - Mato Grosso – MT (pequi sem espinho no caroço).

CAPÍTULO III

- Figura 1: *Caryocar brasiliense* Cambess. **Fonte:** Kerr *et al.* (2007) **92**
- (A) Pequi com espinho no caroço. Fruto seccionado mostrando o caroço cheio de pequenos espinhos (seta).
- (B) Pequi sem espinho no caroço. Fruto seccionado mostrando o caroço sem os espinhos (seta).
- (C) Pequi sem espinho no caroço. Fruto seccionado mostrando o caroço (seta branca).
- Figura 2: Diferenciação de núcleo reticulado (setas brancas) de **97**
metáfase de cromossomos (seta preta) de pequi *Caryocar brasiliense* Cambess.).
- Figura 3: Análise cariotípica por Giemsa do pequizeiro com frutos **98**
com espinho (A) e sem espinho (B) revelando o conjunto diplóide de 46 cromossomos em ambas populações.
- Figura 4: Células de *C. brasiliense* Cambess. coradas com nitrato de **99**
prata para a visualização de NOR, mostrando NOR simples tanto no pequi com espinho (A) (pontos escuros nas células – seta branca) quanto no sem espinho (B) (marcação da NOR no par de cromossomo - seta preta).
- Figura 5: Bandeamento cromossômico com CMA₃ e DAPI, **101**
respectivamente, no pequi com espinho no caroço. As setas brancas mostram os cromossomos ricos em bases nitrogenadas CG. A coloração com DAPI se mostrou negativa em relação à CMA₃.
- Figura 6: Bandeamento cromossômico com CMA₃ e DAPI, **101**
respectivamente, no pequi sem espinho no caroço. As setas brancas indicam os cromossomos marcados com CMA₃, ou seja, cromossomos ricos em bases nitrogenadas CG.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1: <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR para obtenção de marcadores RAPD em <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess., com caroço sem e com espinho.	67
Tabela 2: Análise de Bioinformática (BLASTn) dos clones selecionados, por RAPD em <i>Caryocar brasiliense</i> (Cambess.) com e sem espinho no caroço.	76
Tabela 3: Análise de Bioinformática (BLASTx) dos clones selecionados por RAPD em <i>Caryocar brasiliense</i> (Cambess.) com e sem espinho no caroço.	78

CAPÍTULO IV

Tabela 1: Análise *in silico* (BLASTn) de sequências encontradas no transcriptoma de *Caryocar brasiliense*. **89**

Tabela 2: Análise *in silico* (tBLASTx) de sequências encontradas no transcriptoma de *Caryocar brasiliense*. **90**

APRESENTAÇÃO

O *Caryocar brasiliense*, pequizeiro, é uma espécie nativa do cerrado brasileiro, o qual abrange quase todo o estado de Minas Gerais, onde seu fruto (pequi) é bastante consumido e comercializado. A maior parte dos frutos comercializados em todo Brasil são provenientes do Norte mineiro, sendo Japonvar e Montes Claros, cidades polo para sua produção. O pequi é um fruto rico em vitaminas A e C, com potencial para amenizar a deficiência nessas vitaminas na população brasileira. Além disso, o óleo do pequi é utilizado na indústria farmacêutica e na alimentação humana.

Em 2007 foi encontrado por KERR em aldeia de índios em São José do Xingu uma plantação de pequizeiro produzindo pequi com e sem espinho no caroço.

Com o objetivo de comparar as populações de pequizeiro e seu fruto, foram realizadas análises moleculares e citogenéticas do pequizeiro e do pequi com e sem espinho no caroço.

Essa Tese está dividida em 4 Capítulos: no **Capítulo I** é apresentado um embasamento teórico, com pequena revisão sobre o tema desenvolvido; o **Capítulo II** apresenta a análise, por meio de marcadores RAPD, de populações de pequizeiros produtores de frutos com e sem espinho no caroço; o **Capítulo III** apresenta a abordagem citogenética de *C. brasiliense* e o **Capítulo IV** mostra os resultados da análise molecular, com a identificação de sequências expressas em pequi com espinho no caroço.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. O CERRADO

O Cerrado (*latu sensu*) ocupa uma área de aproximadamente 2 milhões de km², representando cerca de 23% do território brasileiro, distribuído principalmente no Planalto Central, sendo o segundo maior bioma do País em extensão, superado apenas pela Floresta Amazônica. Abrange, como área contínua, os estados de Goiás, Tocantins e o Distrito Federal, parte dos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia e São Paulo (Figura 1) e ocorre, também, em áreas disjuntas ao norte, nos Estados do Amapá, Amazonas e ao sul, em pequenas áreas do Pará (Ribeiro; Walter, 1998).

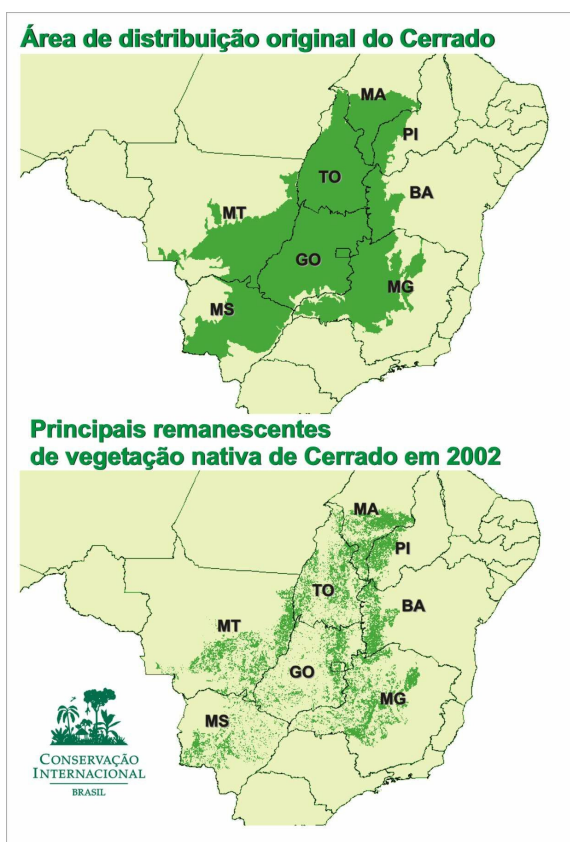


Figura 1: Regiões de Cerrado no Brasil (em verde) com ocorrência de *Caryocar brasiliense* Cambess. Fonte: www.unb.com.br

Esse Bioma consiste de uma vegetação heterogênea, desde floresta mesofítica até uma vegetação savânica, com arbustos, árvores de pequeno porte (Cerrado *sensu stricto*) e campos, que podem ou não apresentar árvores e arbustos esparsos. A vegetação rasteira formada, principalmente, por gramíneas, coexiste com árvores esparsas, baixas, tortuosas, com cascas grossas, folhas largas e sistemas radiculares profundos. A vegetação apresenta características de adaptação à seca, como raízes alcançando profundidades superiores a 10 m, germinação de sementes na época das chuvas e crescimento radicular pronunciado nos primeiros estádios de desenvolvimento (Almeida, 1998; Pinto; Oliveira-Filho, 1999; Sano).

Muitos fatores podem afetar a distribuição das espécies de plantas no Cerrado, como o clima, fertilidade e pH do solo, disponibilidade de água, geomorfologia e topografia, latitude, frequência de fogo e fatores antrópicos, além da interação complexa entre estes fatores (Furley; Ratter, 1988). Apresenta alta biodiversidade, com cerca de 160.000 espécies descritas, incluindo plantas, animais e fungos. O número de arbustos e árvores no cerrado *sensu stricto* pode exceder a 800 espécies das quais, aproximadamente, 80% são endêmicas (Ratter *et al.*, 1997).

O Cerrado vem sofrendo acelerado processo de fragmentação nos últimos anos, principalmente, em decorrência da expansão urbana e das atividades ligadas ao crescimento populacional. As implicações diretas da fragmentação sobre a biodiversidade são a redução indiscriminada das áreas dos biomas e extinção de espécies, além do comprometimento evolutivo das espécies em função da perda de variabilidade genética, que reduz a matéria-prima das populações naturais para ação da seleção e adaptação às mudanças ambientais (Melo-Júnior *et al.*, 2004).

Apesar de possuir grande diversidade de flora, incluindo inúmeras frutíferas de importância extrativista para seus habitantes, os estudos do Cerrado têm contemplado um número relativamente baixo de espécies, se comparado a outros ecossistemas.

Por ser o Cerrado a principal área de expansão agrícola do País, alguns recursos naturais, que são de interesse sócio-econômico para as populações dessa região, são eliminados para dar lugar ao estabelecimento de extensas áreas agropecuárias (Chevez Pozo, 1997).

2. O Pequiheiro, *Caryocar brasiliense* Cambess. Caracterização Botânica

As espécies conhecidas como pequiheiro, e nomes derivados, pertencem à família *Caryocaraceae*, da ordem Theales (Rizobolácea), composta de 25 espécies reunidas em dois gêneros, *Caryocar* e *Anthodiscus*.

É uma frutífera de grande importância na região Norte de Minas, onde o extrativismo dos seus frutos é de relevância para a alimentação do sertanejo, além de constituir-se em fonte de renda (Araújo, 1995; Pozo, 1997). É também, conhecido, de acordo com a região de ocorrência, por pequi, piqui, piquiá-bravo, amêndoa-de-espinho, grão-de-cavalo, pequiá, pequiá-pedra, pequerim, suari e piquiá (Santos *et.al*, 2006).

O nome pequi se origina da palavra tupi “pyqui”, em que Py = casca e qui = espinho (FCTMG citado por Almeida, Silva, 1994).

Como é típico do cerrado, o pequiheiro aparece em cerca de 80% do território mineiro e a maioria da população conhece essa espécie e, principalmente, seu fruto (Santos *et al.*, 2006).

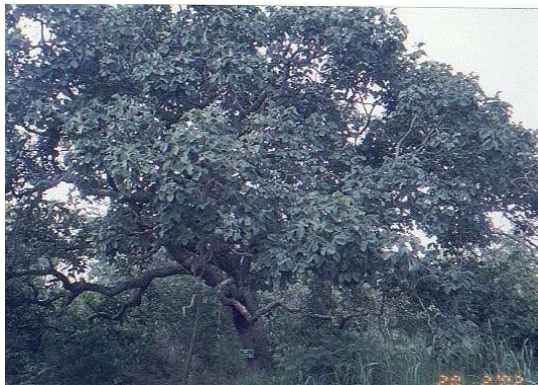
O gênero *Caryocar*, segundo Franco et al. (2004) possui 16 espécies, das quais, 12 são encontradas no território brasileiro. Essa informação difere da obtida por Oliveira (1988) que relata que são 19 espécies, apenas oito de ocorrência no Brasil. Giacometti (1993), sem determinar o número, localizou as espécies de *Caryocar* em sete dos dez centros de origem das frutíferas brasileiras: Centro Alto Noroeste/Rio Negro, com algumas espécies de piquiá (*Caryocar* spp.); Centro Roraima/Manaus (quatro espécies de *Caryocar*); Centro Sudoeste Acre/Rondônia, (*C. villosum*); Centro Nordeste/Caatinga (*C. coriaceum*); Centro Brasil

Central/Cerrado (*Caryocar* spp); Centro Mata Atlântica, setor B; com piqui-vinagreiro (*C. edulis*); e Centro Brasil/Paraguai (*C. brasiliense*).

A espécie de maior presença no cerrado é *C. brasiliense* Cambess., dividida em duas subespécies: *C. brasiliense* subsp. *brasiliense*, de porte arbóreo e com ampla distribuição e *C. brasiliense* subsp. *intermedium*, de porte arbustivo, com ocorrência restrita a algumas partes desse ecossistema (Silva et al., 2001). Oliveira (1988) descreve a ocorrência de *C. brasiliense* nos Estados do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais e na parte alta de São Paulo até o Norte do Paraná e *C. coriaceum*, no Centro-Oeste e parte do Nordeste.

Para Rizzini (1963), nos Cerrados brasileiros encontram-se, além do *C. brasiliense* Camb., o *C. coriaceum* Wittm., espécie que ocorre, também, na Chapada do Araripe no Ceará (Peixoto, 1973). O cerrado é uma vegetação natural, com cerca de 2 milhões de quilômetros quadrados, representando cerca de 22% do território brasileiro (Ratter; Ribeiro, 1996), dos quais, 85% no Planalto Central (Coutinho, 1997) e o restante da área nos Estados do Amazonas, Pará, Ceará, Bahia, Roraima, Maranhão, Piauí, Rio Grande do Norte, Paraíba, Alagoas e Sergipe (Castro, 1997). Diante do exposto, fica mais fácil entender a razão da diversidade de ocorrência das espécies de *Caryocar*, principalmente *C. coriaceum*, em áreas que estão, aparentemente, fora do Cerrado. Na verdade, estão fora do *core* do Cerrado, em áreas típicas ou de transição, o que pode, inclusive, ser tema de estudo sobre a especiação do gênero. A concentração de árvores no campo, em geral, é estimada em 40 plantas por hectare para o *C. brasiliense* (Oliveira, 1988), o que é o esperado nos ecossistemas tropicais. Padrões variáveis foram observados para *C. coriaceum* no Piauí, com 48 plantas por hectare no Centro-Sul do Estado, similar ao padrão observado para *C. brasiliense*, e 78 plantas por hectare no extremo Sul e Sudoeste, valor superior à média do Estado (Comissão Estadual de Planejamento Agrícola - Cepa, 1984, Oliveira et al., 2008).

As informações fenológicas mostram que a espécie é semidecídua, heliófita, seletiva xerófita, característica do cerrado brasileiro. Ocorre, geralmente, em agrupamentos mais ou menos densos, tanto em formações primárias como secundárias e pioneiras (Lorenzi, 2000) (Figura 2) com redução parcial da folhagem durante a estação seca. A floração ocorre logo após a emissão das folhas novas e os frutos alcançam a maturidade entre três e quatro meses após a floração.



(A)



(B)

Figura 2: *Caryocar brasiliense* Cambess., árvore e fruto. (A) Planta adulta do pequizeiro. (B) Detalhe do fruto (setas) Fonte: Kerr et al. (2007)

2.1. Requerimentos ecológicos

Em termos de temperatura, *C. coriaceum* pode ser considerada uma espécie tipicamente tropical, enquanto que *C. brasiliense* se adapta a maior variedade de ambientes, do tropical ao subtropical (Oliveira, 1988). Informações disponíveis, juntamente com as observações feitas diretamente nas áreas de ocorrência, mostram que plantas das espécies *C. brasiliense* e *C. coriaceum* são rústicas, sendo, aparentemente, pouco exigentes em relação aos solos. Em áreas com alta densidade populacional do Sudeste de Goiás, Santana (2002), concluiu que a planta se adapta bem em solos com nível nutricional baixo, para a maioria das plantas cultivadas, e que o padrão de desenvolvimento das plantas está

associado ao tipo e ao nível nutricional dos solos; a maior densidade de plantas ocorre nos Cambissolos e Neossolos Litolíticos. Verificou, também, que a altura média e a produção correlacionam-se positivamente com o teor de potássio, e com a saturação em bases do solo.

2.2. Propagação

Nenhuma das espécies de *Caryocar* é domesticada; até mesmo a espécie *C. brasiliense*, a mais explorada comercialmente. Atualmente encontra-se em um estágio intermediário de domesticação para plantas perenes, de acordo com Harlan (1967). A forma natural de propagação é por sementes, não sendo ainda utilizada a propagação assexuada.

Pela variabilidade fenotípica observada nas populações das espécies de *C. brasiliense* e de *C. coriaceum*, é fácil deduzir que as espécies são alógamas. Se, por um lado, isso é interessante para ganhos significativos de seleção, em programas de melhoramento, por outro lado é um fator complicador para a plantios comerciais. Há necessidade, portanto, de estudos com a propagação vegetativa para que os plantios sejam uniformes, mais produtivos e iniciem a produção mais rapidamente (Oliveira et al., 2008).

São escassas as informações sobre a germinação das espécies *Caryocar*. Considera-se que é baixa e lenta, com índices de germinação entre 2,5 a 68,4%, conforme o tratamento utilizado para quebra da dormência (Pereira et al., 2000). Estudos realizados por alguns autores, constataram a ocorrência de dormência dupla, uma associada ao endocarpo e a outra de natureza embriônica (Melo, 1987; Dombroski, 1997). Fica clara, assim, a necessidade de mais estudos sobre o tema, para a orientação de produtores e viveiristas.

Sobre a germinação, Silva et al. (2001), estudando o processo em plantas de uma população de *C. brasiliense* subsp. *intermedium* de porte baixo, encontrada na Região Sul de Minas Gerais, obtiveram 30% de germinação no período de um ano, em sementeira de areia, enquanto que, Santos (2004) obteve maior porcentagem e velocidade de germinação, com o cultivo *in vitro* das sementes.

O fruto é uma drupa e, quando maduro, apresenta epicarpo de coloração verde-clara a levemente amarelada. O caroço (endocarpo) é rígido e espinhoso, sendo uma característica do gênero. A massa que recobre as sementes pode apresentar cor amarela (mais comum), laranja, rósea ou esbranquiçada e é pastosa, farinácea e oleaginosa (Ferreira et al., 1988). Na maioria dos casos, cada fruto contém apenas uma semente desenvolvida, embora seja possível encontrar até quatro sementes (Hoehne, 1923, citado por Barradas, 1972; Peixoto, 1973).

Poucas são as referências sobre as características físicas do fruto, mesmo para *C. brasiliense*, a espécie mais estudada do gênero. Ferreira et al. (1988) verificaram que a casca do fruto maduro representa cerca de 84% do peso, a polpa representa 10% e a semente 6% do peso total. Em *Caryocar villosum*, Silva et al. (2004) encontraram, respectivamente, 76,7%, 10,7% e 12,6%. O peso médio dos frutos foi de 338,3g \pm 55,7; o comprimento 8,0cm \pm 0,3; a largura 8,8cm \pm 0,6 e o número de sementes foi de apenas um.

Em relação à dispersão da semente, embora não sejam encontradas informações científicas, Barradas (1972) observou que formigas saúvas são capazes de carregar as sementes, embora esse não deva ser um processo efetivo de dispersão dado o tamanho e peso das sementes.

Hoehne (1946), citado por Barradas (1972), relatou que o gado bovino seria um meio de dispersão, o que concorda com a informação de Oliveira (1988), sobre a ação de animais. As emas (*Rhea americana*), espécie com maior potencial como agente dispersor, seguida da gralha (*Cyanocorax cristatellus*) e da cotia (*Dasyprocta* sp.), as quais podem atuar como dispersoras de sementes a pequenas distâncias (Gribel, 1986). Há, também, relatos de outros consumidores e dispersores do fruto como o gavião carcará, a saúva, o cupim e um tipo de bezouro (Almeida et al., 1994; Kerr et al., 2007) .

Pela abrangência geográfica da dispersão, associada com os gradientes climáticos que ocorrem no País, é muito variável o período de ocorrência da floração e frutificação das espécies *Caryocar*. Constatou-se uma pequena variação no período de floração, frutificação e maturação (queda) dos frutos de *C.*

coriaceum nas diversas regiões do Piauí, com a floração iniciando no Extremo Sul do Estado de junho a agosto, seguindo-se no Centro-Sul de julho a setembro e, posteriormente, no Norte de setembro a novembro. O período de maturação dos frutos (queda), segue a mesma tendência, iniciando pelo extremo-Sul de setembro a dezembro, no Centro-Sul de outubro a fevereiro e, no Norte, de novembro a março (CEPA, 1984).

A produção de frutos por planta é, em média, baixa e proporcional à altura e diâmetro médio da copa. Esta variabilidade depende, também, do genótipo e do ambiente. A maioria das plantas produz cerca de 500 a 2.000 frutos por safra (Silva, 1998). Alguns dados mostram a estimativa de produção extrativista, tendo por base a densidade de 45 indivíduos/ha, produzindo em média cerca de 180 kg de polpa, 33 kg de amêndoas, 119 kg de óleo de polpa e 15 L de óleo de amêndoa (Almeida; Silva, 1994). Outra estimativa mostra que, para um hectare, são produzidas cerca de 3,7 toneladas de pequi com um rendimento de 30% de óleo, equivalendo a 1.100 kg de óleo, aproximadamente, por safra (Anuário Estatístico Do Brasil, 1994). A Central de Abastecimento de Goiás, no ano de 2002, apresentou os dados de comercialização do fruto no volume de aproximadamente 2.800 toneladas (Goiás, 2002).

3. Perspectivas de melhoramento

A introdução de uma espécie em cultivo passa por algumas etapas, sendo a definição de cultivares a mais importante. A obtenção de variedades e clones, objeto dos programas de melhoramento, atende aos requisitos essenciais para o sucesso de cultivo, do produtor ao consumidor final. A ferramenta básica do melhorista é a variabilidade genética, sem a qual não é possível sucesso. No caso do pequi, não obstante inexistam programas de melhoramento, é possível especular sobre as possibilidades de sucesso em futuro programa, em razão da variabilidade existente nos diversos ambientes de ocorrência das espécies, como comprovaram alguns estudos realizados.

Oliveira (1998) observou em 11 localidades da Região Sudeste do Estado de Goiás, grande variabilidade genética total de *C. brasiliense*. Os caracteres que mais contribuíram para a divergência entre essas populações foram a germinação, o tamanho do fruto e a taxa de desenvolvimento das plântulas. Trindade (1998) encontrou maior variabilidade dentro de subpopulações em ambientes diferentes. Melo Júnior et al. (2003), avaliando quatro populações naturais dessa espécie nos Municípios de Japonvar, Montes Claros, Francisco Sá e Bocaiúva, utilizando isoenzimas, encontraram 100% de polimorfismo nas populações e ausência de endogamia dentro e no conjunto das populações.

Vilela (1998), estudando as variações das populações naturais nos Municípios de Itumirim e Itutinga, ambos em Minas Gerais, quanto ao aspecto nutricional, dentre outros, concluiu que existe variação natural no teor nutricional de provitamina A, lipídios, proteínas e glicídios e que essas variações podem ser empregadas em programas de melhoramento genético.

Considerando que exista variabilidade para todos os caracteres de interesse, tanto agrônômicos, relacionados com a planta como os de qualidade, relacionados com o fruto, é possível esperar sucesso em programa de melhoramento com a espécie *C. coriaceum* no Nordeste brasileiro. A estratégia a ser seguida é a mesma para qualquer espécie com as características do *C. coriaceum*, planta perene, não domesticada e com razoável disponibilidade de

variabilidade genética inexplorada: prospecção genética nas áreas de dispersão, coleção de plantas matrizes, multiplicação e avaliação dos melhores genótipos da fase de prospecção e, finalmente, avaliação das melhores cultivares em unidades de observação. Paralelamente, devem ser realizados estudos para definição de um método de propagação vegetativa, identificação de pragas e doenças e estudos pós-colheita.

4. Características Químicas do Fruto

4.1. Polpa e amêndoa

A polpa do fruto, parte mais importante em termos de utilização, possui teores médios de vitamina C em torno de 72,27 mg/100 g (Sano; Almeida, 1998) valor superior ao encontrado em frutos cítricos como a laranja-da-bahia (47,0 mg), o limão-galego (11,8 mg), a tangerina (46,8 mg) (Franco, 1992). Com relação ao teor de óleo, os valores relatados por Marx et al. (1997) para o *C. villosum* (31,1%) foram superiores aos contidos no abacate (16,0%), babaçu (19,50%) e amendoim cru (48,46%) (Franco, 1992). Em relação às proteínas, os teores encontrados por Ferreira et al. (1988) e Oliveira (1988), variam de 6,71% a 13,5% superiores aos encontrados no abacate que é, em média, 1,80% (Franco, 1992). A porcentagem de cinzas, determinada por Ferreira et al. (1988) foi de 2%, enquanto na amêndoa foi de 5%, indicando que os minerais se concentram nessa parte do fruto. Na amêndoa, o teor de proteína varia de 24 % a 54% e no óleo, de 42,2% a 47% (Ferreira et al., 1988; Oliveira, 1988). Como os minerais são encontrados mais na amêndoa do que na polpa, é importante a atenção em termos de seu aproveitamento na nutrição humana.

O fruto não é consumido *in natura*, sendo o seu consumo direto na culinária, cozido com frango ou com arroz. Na Região Sul do Ceará também é cozido com feijão e utilizado na forma de farofa.

A polpa é utilizada na produção de geléias, doces, ração para porcos e galinhas e obtenção do óleo. Da polpa fermentada é produzido um tipo de licor bastante conhecido e apreciado em algumas regiões do País.

Na tentativa de dispor do fruto na entressafra, algumas cooperativas do Norte de Minas, assessoram produtores em processos de produção, beneficiamento e comercialização de diversos produtos, tais como polpa congelada e diversos tipos de pequi em conserva (Ouro..., 2006). Com ações dessa natureza consegue-se agregar cerca de 50% do valor em relação ao produto *in natura* (Cooperativa..., 2006).

4.2. Carotenóides

Os carotenóides constituem um grupo de compostos lipossolúveis e sua importância dos carotenóides vai além do seu papel pigmentante. São precursores de vitamina A, exibem ação antioxidante, sendo considerados alimentos funcionais. Evidências epidemiológicas demonstram que dietas ricas em carotenóides encontram-se associadas à redução do risco de incidência de câncer e doenças cardiovasculares (Bender, 2005), bem como na proteção de membranas celulares e lipoproteínas contra danos oxidativos (Sies; Stahl, 1995).

O pequi tem uma grande quantidade de carotenóides, porém apenas alguns possuem atividade provitamina A. Os carotenóides encontrados na polpa por Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya (2004) foram a violaxantina, luteína e zeaxantina, como compostos majoritários e β -criptoxantina, β -caroteno e neoxantina em pequenas quantidades. Ramos et al. (2001) identificaram o β -caroteno, ζ -caroteno, criptoflavina, β -criptoxantina, anteraxantina, zeaxantina e mutatoxantina, tanto em polpa crua como cozida. Apresentaram atividade como precursores de vitamina A o β -caroteno, a criptoflavina e β -criptoxantina. Esses autores estudaram, também, o efeito do cozimento sobre os carotenóides pró-vitamínicos A da polpa e observaram perda média de 30,25%, correspondente a uma perda média de 12,11% no teor de provitamina A. A importância deste estudo está no fato de serem raras as referências sobre os valores nutricionais de alimentos cozidos, forma como, normalmente, eles são consumidos.

O conteúdo de carotenóides do pequizeiro pode ser afetado pela constituição genética da planta, pela forma e ambiente de cultivo e pelo grau de maturação dos frutos (Rodriguez-Amaya, 1993, Rodriguezamaya; Kimura, 2004; Gomes et al., 2003). Oliveira et al. (2004) observaram que os teores de lipídios, proteínas, carotenóides totais, β -caroteno e licopeno presentes na polpa são maiores em estágios mais avançados de maturação, informação importante para a definição da época de colheita. Em relação aos fatores ambientais, Vilela et al. (1996) verificaram que o teor de carotenóides foi bastante variável em frutos colhidos em quatro localidades de Minas Gerais, com características ambientais distintas. Os valores médios foram de 8,9 a 23,1 mg/100 mg nos frutos oriundos

de Lavras; de 8,2 a 15,75 mg/100 mg para os de Paraopeba; de 4,05 a 16,35 mg/100 mg nos de Montes Claros e de 8,85 a 16,85 mg/100 mg nos de Brasilândia. O percentual de variação entre o menor e o maior foi de 570%, evidenciando o potencial de melhoramento da espécie. Destaca-se o fato de o menor valor encontrado, 4,05 mg/100mg, ter sido obtido em frutos de polpa branca, indicando o controle genético associado à característica fenotípica.

4.3. Utilização e importância do pequi na alimentação e indústria

O pequi tem se destacado pelo uso de seus frutos na alimentação humana em diversas regiões, através do preparo de pratos típicos, condimentos, óleos e bebidas adocicadas (Almeida; Silva, 1994; Araújo, 1994; Lopes *et.al*, 2003). Em diversas regiões de cerrado do país, o extrativismo dos frutos de pequizeiro constitui-se em uma importante atividade econômica, geradora de renda e emprego. Um exemplo é a região Norte de Minas, onde, segundo Pozo (1997) e Alencar (2000) a colheita e a comercialização dos frutos de pequizeiro, durante a safra de verão de dois meses, dezembro a janeiro, mobiliza 50% da população que vive no campo, representando 54,7% da renda anual do trabalhador rural. Para os produtores rurais do Norte de Minas Gerais, o pequi contribui com 17,73% da renda familiar, atrás do feijão (33,52%) e mandioca (32,64%) (Pozzo, 1997).

A expansão intensiva dos cerrados para produção de carvão vegetal nativo têm colocado em risco a preservação e a variabilidade genética do pequizeiro. Aliado a isso, o extrativismo intensivo dessa espécie pode gerar perda de material genético, já que quase todos os frutos de boa qualidade são coletados e consumidos ou comercializados, o que impede a reprodução natural a partir deles (Santos *et al.*, 2006). Outro fator que pode levar à diminuição da espécie é a presença de uma praga que vem atacando os frutos, tornando-os impróprios para o consumo (Lopes *et al.*, 2003).

O óleo tem diversas utilidades, além de seu emprego na culinária, o foco central de uso desse produto. É utilizado, ainda, na indústria de cosméticos (cremes), de limpeza (sabões) e na indústria de fármacos (Oliveira, 1988), mesmo sem a existência de informações advindas de pesquisas científicas. Porém, como a polpa tem, em média, cerca de 200.000 UI de vitamina A (Peixoto, 1973), pelo menos no suprimento dessa vitamina é garantido algum efeito benéfico à saúde humana.

O óleo de pequi tem potencial de uso na produção de combustíveis e lubrificantes, conforme alguns estudos realizados na USP, Ribeirão Preto, São Paulo (USP, 2005). As pesquisas revelaram na sua primeira fase que, misturado

ao diesel, ele reduz em 30% a emissão de poluentes (Nova..., 2006). Encontra-se em fase de testes o biocombustível obtido da polpa, em carros, caminhões, tratores, geradores de energia elétrica e locomotivas. A Agência Nacional de Petróleo autorizou a mistura de 5% de biocombustível, extraído do pequi, no óleo diesel. A mistura está sendo testada em carros da Universidade Federal de Diamantina, da USP de Ribeirão Preto - SP (USP, 2005).

O potencial como biocombustível se deve à vantagem comparativamente com outras oleaginosas em termos de produção. Enquanto o pequizeiro pode produzir até 3.200 L/ha de biodiesel, a soja rende 400 L/ha. (Nova ..., 2006). Embora algumas plantas nativas apresentem bons resultados em laboratórios, como o pequi, o buriti e a macaúba, existe, ainda, uma enorme distância entre esse potencial e a possibilidade real de viabilização comercial de combustíveis do pequi, em razão da inexistência de sistemas de produção e cultivos do pequizeiro, entretanto, com a adaptação das espécies de *Caryocar*, existe uma ampla diversidade de ecossistemas e demanda crescente por fontes alternativas de energia, assim em um futuro próximo essa poderá vir a ser a principal utilização do pequizeiro.

4.3.1. Madeira

A madeira, com densidade de 0,803 g/cm³, peso específico de 0,88 g/cm³ e resistência média de 67 kg/cm², é considerada de boa qualidade e de grande resistência aos agentes de deterioração. Tem tido diversas utilizações na fabricação de móveis rústicos, caibros, dormentes, moirões, postes, esteios, xilografia, construção civil e em embarcações, além de outro uso menos indicado, como a produção de carvão. A utilização da madeira pode resultar em benefícios para os que a exploram e os que se utilizam dos seus produtos, porém causa danos irreparáveis aos ecossistemas de onde são retiradas em razão da inexistência de programas de manejo e uso da espécie. No Piauí, por exemplo, já foi constatado um estado avançado de erradicação de plantas para a fabricação

de carvão, cercas e utensílios domésticos, principalmente na região de Piripiri (Cepa, 1984).

4.3.2. Casca

A casca, por meio da maceração, produz tanino e uma tintura castanho-escura que é utilizada no tingimento artesanal (RIBEIRO et al., 1982). Algumas vezes, tem sido empregada na alimentação de bovinos, porém, na alimentação humana é mais útil, em virtude do seu elevado teor de fibra alimentar. Barbosa e Amante (2002) elaboraram e caracterizaram a farinha da casca tendo encontrado 5,76% de proteína, superior ao da farinha de trigo (1,76%), 1,54% de lipídios, equivalente ao da farinha de trigo (1,3%), com 80% de rendimento de extração.

Os carboidratos totais representam 50,94%, superior às polpas de araticum (21,50%), pequi (19,66%), buriti (17,19%) e mangaba (8,41%) (SANO e ALMEIDA, 1998). O teor de fibra alimentar foi de 39,97%, superior ao encontrado no fubá integral (1,2%) (El-Dash; Germani, 1994), na farinha de soja integral (3,3%) (El-Dash et al., 1994) e na polpa de pequi (11,60%) (Sano; Almeida, 1998).

4.3.3. Outros empregos do pequizeiro e seu fruto

A busca por fitoterápicos, como alternativa aos quimioterápicos para tratamento de diversas enfermidades, tem levado à identificação de diversas espécies nativas com potencial de produção de substâncias de interesse farmacológico. Entre essas, *C. brasiliense* tem apresentado propriedades terapêuticas no tratamento de diversas enfermidades, como micoses, sem os efeitos colaterais dos antifúngicos convencionais e redução dos efeitos adversos da quimioterapia (Passos et al., 2002; O Poder..., 2006).

À planta e aos seus frutos são atribuídas diversas propriedades medicinais, como a atividade antifúngica encontrada na folha, no óleo essencial da semente, além da ação dos óleos da amêndoa e da semente de *C. brasiliense* Cambess. sobre diversos microrganismos (*Cryptococcus neofarmans* var. *neofarmans* e *Cryptococcus neofarmans* var. *gatti*) (Passos et al., 2002).

5. O pequi sem espinho

A região de ocorrência do pequizeiro abrange, aproximadamente, 2000 municípios e estima-se em cerca de 40000 coletores para vender os frutos ou os caroços aos compradores ou atravessadores. As pequenas farmácias e curandeiros das vilas e cidades dessas regiões, na época de colheita, são procurados por cerca de 3000 pessoas para retirarem os espinhos deixados pelos caroços (putâmens ou endocarpo) no “céu da boca” de consumidores descuidados. Essa característica é o principal defeito que elimina o pequi de ser cultivado em casa e de ser considerado uma fruta de mercado (Kerr *et al.*, 2007).

Na cidade de São José do Xingu, Kerr *et al.*(2007) encontraram uma planta que produz frutos com caroços sem espinhos (Figura 3), os quais, são carnudos, um pouco mais doces do que os que contém espinhos segundo esses autores.



(A)



(B)

Figura 3: Pequi com espinho e o sem espinho no caroço. A) Pequi com espinho no caroço. Fruto seccionado mostrando o caroço cheio de pequenos espinhos (seta).

B) Pequi sem espinho no caroço. Fruto seccionado mostrando o caroço sem os espinhos (seta). **Fonte:** Kerr *et al.* (2007)

Essa característica nos levou ao estudo do pequi sem espinho com o objetivo de fazer distribuição de mudas, produzidas por micropropagação, desse pequi. Essa característica pode transformar o pequi em fruta de mercado, tanto para as populações locais quanto para os mercados regulares de frutas nacionais e estrangeiras e, ainda, facilitar para a extração de óleo do pequi para a produção de biocombustíveis.

6. Biologia Molecular

6.1. Marcadores moleculares

Marcador molecular é característica de um sítio de heterozigose de DNA que pode ou não estar associado à variação no fenótipo, que é usado como marcação para um locus cromossômico. É herdado geneticamente e quando o locus determina alteração fenotípica, pode ser usado para diferenciar indivíduos, tecidos, organismos em condições diferentes. O uso desta ferramenta facilita o trabalho de melhoramento genético de plantas, pois fornece um número ilimitado de polimorfismos do DNA, independentes dos efeitos ambientais e do estágio fisiológico da planta. Permite a identificação precoce e precisa de indivíduos com a melhor combinação de alelos favoráveis, que podem ser usados no melhoramento genético (Lanza *et al.*, 2000).

Até a década de 60, predominavam os marcadores morfológicos, geralmente, fenótipos de fácil identificação (nanismo, deficiência clorótica, cor de pétalas ou morfologia foliar). A disponibilidade de marcadores morfológicos era restrita às poucas espécies de plantas utilizadas como modelo para o estudo da genética, como milho, tomate e ervilha. A partir da década de 70 surgiram os marcadores moleculares, fragmentos de DNA que podem caracterizar o genótipo de um indivíduo a partir de amostras de células ou tecidos, com a vantagem de poderem ser utilizados em qualquer fase de crescimento do indivíduo e a aplicabilidade da técnica passou a incluir, potencialmente, todas as espécies de plantas.

Várias formas de análises moleculares foram sendo utilizadas, primeiramente o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) com a utilização de enzimas de restrição para a análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos resultantes de restrição do DNA. Em seguida, os minissatélites (VNTR – *Variable Number of Tandem Repeats*) com o uso de diversas classes de seqüência repetitivas de DNA e a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) como processo de amplificação em cadeia de pequena porção de DNA. O grande

avanço na área ocorreu em 1990 com o emprego de *primers* ou iniciadores aleatórios, que são seqüências curtas de DNA que se pareiam com o DNA-molde e servem de iniciadores para a síntese *in vitro* de uma nova fita de DNA (Ferreira; Grattapaglia, 1998; Lanza *et al.*, 2000), eliminando assim o conhecimento prévio da seqüência. Esta técnica recebeu o nome de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ou DNA polimórfico amplificado ao acaso.

Os marcadores revelam diferenças genéticas em maior nível de detalhamento e sem as interferências causadas pelo efeito ambiental, oferecendo vantagens em termos de discriminação e rapidez (Binneck *et al.*, 2002) e trazem contribuições significativas para a compreensão da diversidade genética (Spoonder *et al.*, 2005).

O principal benefício de usar marcadores moleculares em plantas é que são bons indicadores da distância genética entre acessos e estão sendo utilizados para auxiliar o curador nas atividades de manutenção, caracterização e avaliação de germoplasma.

6.2. Marcadores moleculares baseados em PCR – *Polymerase Chain Reaction*

A tecnologia da reação de polimerase em cadeia (PCR) foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80. Por ser fácil, rápida e versátil, a PCR tornou-se uma técnica poderosa para estudos genéticos moleculares, envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo. Uma das variações da PCR é a tecnologia RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) ou DNA polimórfico amplificado ao acaso, que envolve a amplificação simultânea de vários locos anônimos do genoma utilizando iniciadores de seqüência arbitrária (Ferreira; Grattapaglia, 1998).

A técnica de PCR envolve a síntese enzimática, *in vitro*, de milhões de cópias de um segmento específico de DNA em presença da enzima *Taq* polimerase em uma reação em três etapas (desnaturação, anelamento e extensão) que depois de vários ciclos, produz mais de um milhão de vezes a quantidade inicial da seqüência alvo. Com esta escala de amplificação é possível

iniciar uma análise com quantidades mínimas de DNA, da ordem de alguns picogramas ou nanogramas. Em função da grande quantidade de DNA produzido, o segmento amplificado pode ser visualizado diretamente sob a forma de uma banda em gel de eletroforese, corada com Brometo de Etídio e sob luz ultravioleta (Ferreira; Grattapaglia, 1998).

A PCR é sensível às alterações nas condições de amplificação, impurezas no DNA e qualidade dos reagentes.

6.3 Marcadores Moleculares RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*

A técnica RAPD, DNA polimórfico amplificado ao acaso, foi desenvolvida em 1990 a partir da PCR, com utilização de *primers* mais curtos e de seqüência arbitrária para a reação de amplificação, eliminando a necessidade do conhecimento prévio de seqüência. Utiliza um tipo de *primer* em cada reação, sendo esse formado por diferentes combinações das quatro bases nitrogenadas, com um conteúdo de G+C entre 50 e 70% (Fritsch; Roeseberg, 1996).

Essa técnica gera grande quantidade de polimorfismo de segmentos de DNA, distribuídos por todo o genoma do organismo e, ainda, oferece a possibilidade de detectar regiões de DNA repetitivo já que são marcadores neutros (Williams *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1993; Ferreira; Grattapaglia, 1995). A detecção do polimorfismo se dá pela visualização de forma direta das bandas no gel. Os fragmentos gerados por RAPD uma vez amplificados e separados por eletroforese, podem ser facilmente isolados do gel, mantidos na forma de uma biblioteca genômica e amplificados, via PCR, quando necessário. O custo da técnica RAPD é mais baixo, é simples e rápido de se obter resultados, exige um menor número de reagentes e de DNA do que a técnica RFLP e possibilita estudo de espécies sobre as quais não se tem nenhum tipo de informação genética e espécies com pouco ou nenhum polimorfismo em locos isoenzimáticos (Ferreira; Grattapaglia 1998; Baptista, 2002; Lacerda *et al.*; 2002; Araújo *et al.*, 2003; Monteleone *et al.*, 2006).

Experimentos típicos de programas de melhoramento, análise de diversidade genética em populações naturais, estudo de filogenia e caracterização de bancos de germoplasma envolvem tipicamente centenas ou milhares de indivíduos (Burstin *et al.*, 2001, Rossetto *et al.*, 2002, Pham *et al.*, 2003, Phan 2003, Bui; Lang 2004; Lang *et al.*, 2007). Nesse contexto, a técnica RAPD permite a análise genética para grande número de marcadores, sem exigência de laboratório sofisticado (Monteleone *et al.*, 2006).

7. Genômica Funcional

O advento de tecnologias de seqüenciamento de genoma tem gerado informações de seqüências de DNA de muitas espécies de plantas. Com a disponibilidade de bancos de dados de genoma, pode-se prever a possível função de um gene com base na informação de sua seqüência e identificar genes candidatos envolvidos em uma via bioquímica específica (Ramalingam *et al.*, 2003). Os genes candidatos ou seqüências de DNA com função predita estão sendo usados como marcadores moleculares para associar fenótipos expressos em coleções de germoplasma ou populações segregantes (Hu *et al.*, 2003).

O emprego de marcadores, baseados em genes candidatos, na caracterização do germoplasma constitui-se em ferramenta útil na análise da diversidade genética, pois aumenta a probabilidade da variabilidade observada refletir diferenças fenotípicas, o que pode não acontecer com o polimorfismo refletido pelos marcadores randômicos (Benchimol, 2008).

Um gene identificado como relacionado a uma dada característica agrônômica de interesse (fenótipo, doença, condição...) pode ser considerado um gene candidato (Varshney; Rajeev, 2007) e pode ser analisado em duas categorias: 1) *posicional*: associado ao caráter, baseado na localização de um gene no cromossomo (estratégias: QTL – Quantitative Trait Locus ou *map-based cloning*); 2) *funcional*: a função tem algo em comum, biologicamente, com a característica sob investigação (estratégias: Transcriptoma, Expressão gênica). Na verdade, a definição de genes candidatos difere entre fisiologistas e geneticistas. Enquanto os fisiologistas consideram como candidatos todos os genes envolvidos na expressão de uma dada característica, os geneticistas consideram candidatos apenas aqueles genes que refletem polimorfismos, *putativamente* envolvidos na variação de uma característica, baseado em sua função biológica e/ou posição de mapa (Pflieger *et al.*, 2001).

A identificação de genes candidatos segue três passos cronológicos de acordo com Pflieger *et al.* (2001). Em primeiro lugar, os candidatos são identificados com base em estudos moleculares ou fisiológicos (funcionais) ou na

análise de ligação de um loco que está sendo caracterizado. Todos os possíveis genes ligados a esse loco são candidatos posicionais. Em segundo lugar, deve ser encontrado um polimorfismo molecular para localizar os genes candidatos em um mapa genético, de forma a encontrar ligação entre genes candidatos e o loco em questão ou deve-se calcular correlação estatística entre os polimorfismos dos genes candidatos e a variação fenotípica em um conjunto de indivíduos não relacionados. Em terceiro lugar, deve haver a co-segregação no mapa ou uma correlação estatística deve ser encontrada e experimentos complementares devem ser conduzidos para confirmar o envolvimento dos genes candidatos, na variação da característica.

A exploração de informações a partir de espécies-modelo aliada à conservação gênica entre espécies relacionadas tem possibilitado a busca de genes candidatos.

Várias técnicas têm sido utilizadas para análise genômica e do transcriptoma (RT-PCR, microarray, differential display,...) com o objetivo de identificar genes de interesse em estudos agronômicos, biológicos, da área da saúde e indústria.

8. Citogenética

8.1 Evolução cariotípica das plantas

As estimativas de ocorrência de poliploidia nas plantas com flores são variáveis, desde aquelas mais conservadoras de 30 a 35% (Stebbins, 1971), passando por valores de 47% (Grant, 1971), 67% (Lewis, 1980b), maior do que 70% (Goldblatt, 1980) até as mais recentes que sugerem que 95% das pteridófitas e até 80 % das angiospermas sejam poliplóides (Leitch; Bennet, 1997). A ocorrência de poliploidia é rara nas gimnospermas e altamente variável nas angiospermas, sendo que 43% das dicotiledôneas (principalmente das famílias Rosaceae, Rubiaceae e Compositae) e 58% das monocotiledôneas (principalmente das famílias Iridaceae e Gramineae) são poliplóides (Grant, 1971). A hibridação seguida de poliploidia foi importantíssima na evolução, já que a duplicação cromossômica restaura a fertilidade nos híbridos, regularizando o pareamento meiótico (Stebbins, 1971).

Poliplóides em geral são bons colonizadores, podendo ocupar habitats pioneiros nos quais os ancestrais diplóides não são bem sucedidos (De Wet, 1980). Apresentam também um efeito tamponante maior em relação à capacidade de adaptação, pois por possuírem mais cópias genômicas dos que os diplóides, podem acumular mais variabilidade encoberta. Taxonomicamente os poliplóides podem ser um problema de equação complicada. Seriam citótipos de nível de ploidia diferente, raças cromossômicas de uma mesma espécie ou, aplicando-se o conceito biológico de espécie, seriam espécies diferentes, já que não haveria fluxo gênico entre as diferentes formas.

Durante a evolução há uma tendência à diploidização, ou seja, ao funcionamento do poliplóide como se fosse um diplóide, tanto no pareamento cromossômico como na herança. A opinião mais aceita e generalizada tem sido a de que os alopólíplóides são muito mais comuns na natureza do que os autopólíplóides (Stebbins, 1971; 1980) e que a alopólíploidia teria tido um papel muito mais importante na evolução e especiação do que a autopólíploidia.

Entretanto, Ramsey; Schemske (1998), em uma extensa revisão e reanálise de registros de poliploidia na natureza, concluíram que a taxa de formação de autopoliplóides pode, frequentemente, ser maior que a de alopoliplóides .

Aproximadamente 40% das espécies cultivadas são poliplóides (Simmonds, 1980), como alfafa (*Medicago sativa*), algodão (*Gossypium hirsutum*), batata (*Solanum tuberosum*), batata doce (*Ipomoea batatas*), café (*Coffea arabica*), cana de açúcar (*Saccharum officinarum*), fumo (*Nicotiana tabacum*), morango (*Fragaria ananassa*), trigo (*Triticum aestivum*), dentre outras.

Entretanto, não há necessariamente uma relação entre poliploidia e domesticação. Hilu (1993) comparou a proporção de poliplóides em diversos tipos de culturas, anuais, perenes, produtoras de sementes ou cultivadas por suas partes vegetativas, em relação à taxonomia, habitat e estratégias reprodutivas e concluiu que a poliploidia não facilitou nem dificultou a domesticação.

A poliploidia induzida pode ser uma poderosa ferramenta para o melhoramento genético. Após a descoberta do efeito poliploidizante da colchicina (Blakeslee; Avery, 1937), a indução de poliploidia teve uma época áurea, em que tentava-se poliploidizar o maior número possível de plantas cultivadas, mas, com o passar do tempo, esta técnica consagrou-se como uma ferramenta auxiliar em certos casos específicos de melhoramento (Evans, 1981). No melhoramento, a indução de poliploidia pode ser utilizada de três maneiras básicas: por poliploidização na espécie, como um modo de tentar conseguir plantas maiores e melhores, já que poliplóides em geral são maiores e mais robustos que seus genitores diplóides, apresentando o chamado efeito "*gigas*"; por poliploidização de um híbrido, neste caso para restaurar a fertilidade do híbrido estéril, sintetizar uma nova espécie ou ressintetizar uma já existente ou como uma ponte para transferir genes de interesse entre níveis de ploidia diferentes, intra ou interespecíficos (Dewey, 1980). Além da indução de poliploidia somática por colchicina, óxido nítrico e outros antimitóticos, pela qual há uma tendência à homozigose, o processo também pode ser feito de modo sexual, através da seleção e cruzamento de plantas com altas frequências de gametas não reduzidos, ou seja, gametas com o número somático de cromossomos. A poliploidização sexual

permite manter a heterozigose e, também, pode ser utilizada como ponte para transferir genes de interesse entre níveis de ploidia diferentes (Ramanna, 1992; Ramsey; Schemske, 1998; Schifino-Wittmann; Dall’Agnol, 2001).

A poliploidia parece ser um processo muito mais dinâmico e em andamento nas plantas do que em outros organismos (Ramsey; Schemske, 2002).

Um comportamento comum aos poliplóides estabelecidos é sua diploidização, ou seja, apesar de terem mais de dois genomas, iguais ou semelhantes, a tendência é que, ao longo do tempo, passem a comportar-se como diplóides. Isto tanto no nível da herança gênica, que tende a passar de multissômica a dissômica, como no nível do pareamento cromossômico na meiose; enquanto em poliplóides jovens é comum a formação de multivalentes (Ramsey; Schemske, 2002), a tendência, mesmo em autopoliplóides, é a regularização do pareamento, com formação exclusiva, ou quase, de bivalentes. O genoma do poliplóide é reestruturado e passa a comportar-se como diplóide.

No nível gênico, a duplicação gênica é a consequência imediata da poliploidização. Alguns processos em poliplóides operam acima do nível organizacional dos genes duplicados, como mudanças cromossômicas intergenômicas, evolução saltatória não Mendeliana, invasão intergenômica e estabilização citonuclear (Wendel, 2000). Há cada vez mais evidências demonstrando que uma ampla e muitas vezes rápida, mudança genômica pode ocorrer após a formação dos poliplóides, em todos os níveis do genoma, do DNA ao cromossomo (Leitch; Bennet, 1997; Soltis; Soltis, 1999). Apesar de ainda não estarem bem entendidas as causas de variação nova nos poliplóides, podem envolver variação em expressão gênica regulada pela dose, interações regulatórias alteradas e rápidas mudanças genéticas e epigenéticas (Osborn et al., 2003). A poliploidização pode representar um período de transição durante o qual mudanças genômicas ocorrem, potencialmente produzindo novos complexos gênicos e facilitando evolução rápida (Soltis; Soltis, 1999).

Muitas das informações sobre o assunto foram obtidas através de poliplóides existentes ou através da ressíntese de poliplóides conhecidos. Mesmo considerando que poliplóides já estabelecidos, freqüentemente, mostram uma

amplitude de variação, ausente de seus prováveis progenitores diplóides, aspectos como a contribuição potencial das mudanças genéticas e epigenéticas para esta variação são difíceis de serem avaliados, já que muitas vezes os genomas contribuintes são desconhecidos ou passaram por mudanças evolutivas desde a formação do poliplóide (Osborn et al., 2003). O estudo no nível de seqüências de DNA em organismos modelos, cujos genomas mostram claras evidências de duplicação genômica, são muito importantes, pois indicam como são ou seriam os produtos da duplicação genômica (Wolfe, 2001). Todas as informações recentes mostram que a diploidização ocorreu por uma ampla reestruturação genômica, com alterações e mudanças no nível gênico, incluindo evolução coordenada, silenciamento gênico, reestruturação cromossômica, ação de transposons e novos padrões de expressão gênica. Entretanto, a base genética da diploidização, ou seja, o processo evolutivo pelo qual um genoma poliplóide se transforma em um diplóide ainda é um grande mistério (Wolfe, 2001).

A técnica de Hibridização *in situ* Genômica (GISH) demonstrou a extensão e rapidez da reorganização intra e intergenômica nos poliplóides no nível cromossômico, verificando rearranjos entre diferentes genomas e cromossomos de poliplóides, o que, anteriormente, era considerado mínimo, como em *Nicotiana tabacum* e *Avena fatua*, nas quais foram identificadas, respectivamente, nove e oito translocações entre os genomas ancestrais (Leitch; Bennet, 1997; Datson; Murray, 2003).

Genes duplicados por poliploidia podem reter sua função original ou similar, sofrer diversificação na função ou na regulação ou uma das cópias pode ser silenciada através de mutação ou mudanças epigenéticas. Genes duplicados podem também interagir através de recombinação interlocos, conversão gênica ou evolução coordenada. Duplicação gênica e conseqüente silenciamento, são dois dos aspectos mais marcantes da evolução por poliploidia, mas as taxas de silenciamento são mais baixas do que esperado pelos modelos de genética de populações, pela possibilidade de manutenção de uma função similar, aquisição de novas funções e interação entre genes duplicados (Wendel, 2000).

Em alguns poliplóides os genes duplicados podem sofrer uma divergência imediata de função (Otto, 2003). A extensão e a rapidez da reestruturação genômica pode variar de planta para planta. Os alopoliplóides naturais mostram uma extensa reorganização quando comparados com seus progenitores diplóides, e grandes mudanças genômicas são verificadas já em poucas gerações de alopoliplóides sintéticos (Soltis; Soltis, 1999). Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas alopoliploidização, pode representar uma adaptação ao estresse genômico causado pela hibridação e pela poliploidização (Ozkan et al., 2003).

O progresso no conhecimento da importância e mecanismos da poliploidia em plantas, principalmente pelo acúmulo de conhecimento nas duas últimas décadas, mostra que a maioria das espécies poliplóides são polifiléticas, que muitas das espécies ditas diplóides são, na realidade, poliplóides antigos e que a evolução por poliploidia foi acompanhada por uma extensa reorganização em todos os níveis do genoma, incluindo repadronização cromossômica, silenciamento gênico, eliminação de seqüências, ação de elementos transponíveis, efeitos de dose gênica, invasão intergenômica e efeitos epigenéticos.

8.2. Início da citogenética

No início do século XX, ficou estabelecida a importância fundamental dos cromossomos na herdabilidade de características genéticas (Ohmido, 1995, Burkholder; Duczek, 1982; Santi-Rampazzo, 2008).

Para Longley (1925) o estudo da morfologia dos cromossomos, tal como o tamanho cromossômico, permitiu a caracterização individual do complemento genômico de plantas e animais pelos primeiros pesquisadores no final do século IX. Segundo Giannoni; Lui (1988) e Sybenga (1992) a análise do genoma, em termos de número e morfologia cromossômicos recebeu a denominação de cariótipo, que é típico de cada espécie. Os cromossomos podem ser visualizados por microscopia óptica, na fase de metáfase mitótica, quando a dimensão e a

localização da constrição primária (centrômero) e secundária (região organizadora nucleolar) podem ser observadas com facilidade.

Funcionalmente, os aspectos morfológicos mais importantes dos cromossomos são o centrômero, a constrição secundária e o telômero (Guerra, 1988; Sybenga, 1992). O centrômero corresponde a uma constrição limitante em cromossomos metafásicos mitóticos e, normalmente, é um componente estrutural único e visível (Thompson et al., 1991; Sybenga, 1992). É o local onde ocorre a reunião das cromátides-irmãs.

A região organizadora nucleolar (RON) é um segmento cromossômico que apresenta cópias gênicas múltiplas de 500 a 1000 cópias, dos dois maiores fragmentos 18S e 28 S do rRNA em eucariotos (Sybenga, 1992; Fukui; Nakayama, 1996; Caixeiro, 1999).

Os telômeros são estruturas localizadas nas extremidades distais dos cromossomos e promovem a proteção das terminações de DNA contra o ataque de nucleases ou contra a fusão comossômica (Kipling, 1995).

As metodologias de pesquisa desenvolvidas com a finalidade de verificar a estrutura e os componentes químicos cromossômicos têm proporcionado refinamentos graduais da citogenética, Essas metodologias promoveram a resolução detalhada de cromossomos quanto à localização de locos gênicos e à análise de seus componentes químicos (Sharma; Sharma, 1999).

No século XX, a citogenética foi amplamente utilizada em trabalhos que envolvem caracterização taxonômica, evolução e filogenia nos mais diversos grupos vegetais (Stuessy, 1990).

A variabilidade em números cromossômicos continua, ainda, sendo o parâmetro cariológico mais amplamente utilizado nas análises cromossômicas (Guerra, 2000a).

8.3. Cromossomos e Morfologia Cromossômica

Segundo Walker; Rapley (1999), por ocasião do início do século 20, o estudo microscópico de células em divisão mostrava que o número de cromossomos era constante no interior de células de mesma espécie, mas variava em número, geralmente, entre as espécies. Em uma célula, os cromossomos variavam em tamanho e forma, com duas cópias de cada tipo presentes em cada célula somática. Foi observado, também, que seu número dobrava (para dois pares) antes da divisão celular, e que cada célula filha recebia um dos pares (mantendo o número normal de cromossomos).

Em preparações coradas, vistas à microscopia óptica, os cromossomos aparentam possuir poucas características morfológicas definidas, pelas quais pode-se diferenciar os membros de um conjunto. As características mais importantes são: comprimento, posição do centrômero e tamanho relativo dos braços, presença de satélites (caso haja), destacados pelas constrictões secundárias (Burns, 1986).

8.4. Bandeamento Cromossômico

O progresso na identificação positiva dos cromossomos se originou de uma rápida série de estudos que iniciaram em 1968 e 1969, com o trabalho de Caspersson e colaboradores, na Suécia. A base desta mudança foi o fato de que muitos corantes que têm uma afinidade pelo DNA, fluorescem sob a luz ultravioleta. Após tratamento adequado com esses corantes, cada cromossomo mostra zonas brilhantes e escuras ou bandas, que são específicas em tamanho e localização para o cromossomo, característica é melhor visualizada na metáfase.

O descobrimento das técnicas de bandeamento cromossômico permitiu um significativo progresso na citogenética geral. Segundo Guerra (1988), as técnicas de bandeamento cromossômico ampliaram os horizontes da citogenética, sendo a primeira aplicação foi no pareamento cromossômico e montagem de cariótipos, em que cada par cromossômico apresenta um padrão distinto e bem característico de bandas. Exemplo disso foi o sucesso considerável obtido com a quinacrina

mostarda, que produziu bandas fluorescentes de vários graus de brilho, as quais foram denominadas de bandas Q. A coloração com Giemsa, seguidas do tratamento com tripsina ou tampão fosfato, que produz um tipo único de bandas, conhecidas como bandas G (Burns, 1986) e a variação no método de Giemsa produz padrão de bandas que são o reverso das bandas G, isto é, as bandas G escuras são as bandas R claras e viceversa.

Na modificação do método de Giemsa, o tratamento com álcalis proporciona às células uma coloração densa da região do centrômero, e isto produz o bandeamento C, que é específico para heterocromatina constitutiva. A região centromérica que inclui o DNA repetitivo, responde apenas à técnica de bandeamento C, assim como qualquer região intercalar que contenha DNA repetitivo (Burns, 1986; Carvalho & Recco-Pimentel, 2001).

Os bandeamentos Q, G e C são especialmente importantes para a citogenética, porque permitem identificar pequenas variações estruturais como, deleções, duplicações, inversões, geralmente relacionadas com determinadas anomalias do desenvolvimento. Além disso, é possível localizar exatamente a região do cromossomo diretamente afetada, que seria impossível com a coloração convencional. Semelhante em outras espécies, essas técnicas têm possibilitado compreender melhor as alterações cromossômicas que se estabeleceram em cada cariótipo (Guerra, 1988), uma vez que as bandas aparecem por diferenças na distribuição de componentes cromatínicos ou mesmo por diferença na composição química da cromatina ao longo do cromossomo.

Uma grande variedade de fluorocromos tem sido usada na marcação de cromossomos e na produção de padrões característicos de fluorescência (Verma; Babu, 1995) por proporcionarem uma análise mais refinada das amostras cromossômicas (Sharma; Sharma, 1999). Os fluorocromos ou substâncias fluorescentes podem ser de dois tipos diferentes com relação às afinidades pelos pares de bases do DNA e muitos dos procedimentos de marcação são amplamente utilizados em padrões de bandeamento, quando em combinação com outro DNA ligante apropriado. Esses métodos envolvem a marcação dos

cromossomos com duas substâncias quimicamente diferentes e são conhecidos como dupla marcação e contraste (Verma; Babu, 1995).

8.5. Hibridização *in situ*

Os marcadores citogenéticos, como os marcadores de DNA, têm sua expressão independente das variações ambientais ou da ativação gênica, tornando-os caracteres muito confiáveis. Atualmente, grande ênfase está sendo dada para a técnica de Hibridização In Situ (HIS) ou In Situ Hybridization (ISH), sendo que seu desenvolvimento marcou a transição da era da citogenética clássica para a era da citogenética molecular, uma vez que esta técnica proporciona a interação entre conhecimento da biologia celular, citogenética clássica e genética molecular. Baseia-se no fato do DNA ser formado por duas fitas complementares, as quais podem ser facilmente desnaturadas e posteriormente renaturadas, voltando ao estado de fita dupla. Se no momento da renaturação das fitas de DNA houver fragmentos de DNA marcados (sonda) disponíveis, os mesmos hibridizarão na região de homologia dentro da célula, permitindo a sua localização precisa, tanto em cromossomos metafásicos, como em núcleos interfásicos. Com a utilização dos fluorocromos, a técnica de HIS começou a ser chamada de FISH - Fluorescent In Situ Hybridization. Esta técnica foi descrita por Pardue & Gall (1969) na qual utilizavam primeiramente sondas marcadas radioativamente. Atualmente, os protocolos usam sondas não radioativas, que apresentam vantagens como a alta resolução, menor tempo de processamento, estabilidade e riscos menores na manipulação. A marcação isotópica adiciona enzimas, haptenos ou fluorocromos. Os protocolos baseados na hibridação *in situ* não isotópica auxiliam na detecção de diferentes alvos na mesma célula por meio do uso de duas ou mais sondas marcadas diferencialmente. Atualmente a detecção é realizada por fluorocromos (moléculas que fluorescem quando excitadas por um comprimento de onda de luz ultravioleta específico) (Rogatto & Rainho, 2000).

O desenvolvimento da técnica de hibridização *in situ* tem possibilitado a identificação de seqüências de DNA em cromossomos mitóticos ou meióticos, em

núcleos interfásicos e em fibras de cromatina estendidas. Essa técnica envolve a preparação de lâminas, o isolamento e a marcação da seqüência de DNA que se deseja localizar *in situ* e a sua hibridização nos cromossomos. O DNA marcado funciona como uma sonda para encontrar as seqüências do DNA cromossomal complementar a ela, chamada de DNA alvo. Para visualizar as regiões hibridizadas com sonda, é preciso associar um corante à sonda e um outro corante ao restante dos cromossomos (Brasileiro-Vidal & Guerra, 2002).

A detecção dessas seqüências de DNA tem originado grandes avanços na citogenética de plantas, destacando-se a construção de mapas físicos, a investigação detalhada da estrutura cromossômica, o acompanhamento da quantidade de cromatina introgridida em cruzamentos interespecíficos e a análise de pareamentos intergenômicos em plantas híbridas. Através da hibridização *in situ*, muitas seqüências de DNA têm sido visualizadas, desde cópias únicas ou com baixo número de cópias até aquelas altamente repetitivas. A localização desses sítios tem fornecido importantes informações sobre a estrutura e a evolução dos genomas, além de permitir a detecção de alterações cromossômicas estruturais (Brasileiro-Vidal & Guerra, 2002).

Segundo Guerra (1988), essa técnica envolve três etapas principais. Na primeira etapa, o DNA satélite de um indivíduo é isolado e o restante do DNA é colocado em meio contendo timidina tritiada para replicação. O DNA sintetizado é uma cópia perfeita do satélite original, que é radioativo. Como o DNA é uma cadeia dupla, após a replicação somente a cadeia recém sintetizada é marcada. A mesma é isolada, para ser utilizada posteriormente como indicador dos locais onde existe DNA satélite. A segunda etapa, consiste na preparação de lâminas com cromossomos do mesmo indivíduo que foi utilizado para a extração do DNA satélite. Ao preparar a lâmina sem corar, os cromossomos são tratados com soluções básicas ou com temperaturas elevadas, que induzem a separação das duas cadeias de todo o DNA dos cromossomos. A terceira etapa, consiste na exposição desses cromossomos com as cadeias separadas à solução contendo as cadeias simples de DNA satélite marcado. Esse DNA se pareia com o DNA satélite marcado dos cromossomos com seqüências de nucleotídeos

complementares à sua, revelando a localização exata desse tipo de DNA, ou seja, a heterocromatina constitutiva do cromossomo.

A HIS pode, também, utilizar como sonda o DNA genômico total de uma espécie, proporcionando a marcação de todos os seus cromossomos. Esse tipo de hibridização é denominado de GISH - Genomic In Situ Hybridization. Neste caso, pode-se distinguir os cromossomos oriundos de diferentes parentais, em híbridos interespecíficos ou em espécies aloploplóides bem como em estudos de similaridade genômica (Brasileiro- Vidal & Guerra, 2002). As bibliotecas de DNA genômico representam uma importante fonte de seqüências para o mapeamento físico, análise estrutural do genoma, genômica comparativa e seqüenciamento do genoma, além de ser uma fonte de seqüências únicas para o mapeamento cromossômico (Hasterok et al., 2006).

As condições de hibridização devem ser escolhidas cuidadosamente, de acordo com a natureza da sonda e aplicação desejada (Walker & Rapley, 1999).

4. Objetivos

O presente trabalho teve por objetivos:

- ✓ Verificar o padrão de polimorfismo de DNA, por meio de marcadores RAPD, entre populações de pequi com o caroço espinhoso e sem espinho.

- ✓ Identificar citogeneticamente o pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess.) com e sem espinho no caroço utilizando análise convencional de Giemsa, região organizadora de nucléolo (NOR), bandeamento C e fluorocromos: cromomicina (CMA₃) e 4'-6'-Diamino-2-Phenylindole (DAPI).

- ✓ Identificar seqüências expressas que estejam envolvidas em vias metabólicas no fruto do pequi com espinho, que possam contribuir para conhecimento da espécie, suas propriedades biológicas e genéticas.

Referências Bibliográficas

ALENCAR, G. Pequizeiros enfrentam riscos de extinção. **Hoje em dia**, 13 fev., p.7, 2000.

ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A. **Piqui e buriti**: importância alimentar para a população dos Cerrados. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1994. 38 p.

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

ALMEIDA, S.P.; SILVA, J.A. Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos cerrados. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1994. 38P. (Documentos, 54).

ALTSCHUL S.F.; GISH, W.; MYERS E.W.; LIPMAN. D.J. **J. Molec. Biol.** Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. V. 215; p. 403-410, 1990.

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. Rio de Janeiro: IBGE, v. 54, p. 3-47, 1994.

ARAÚJO, E. S. **Diversidade genética e acúmulo de proteína de reserva em arroz da Baixada Maranhense-MA**. 2003. 60p. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciências do solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

ARAÚJO, F.D. de. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) na economically valuable of central Brazilian Cerrados. **Economic Botany**, v.49, p.40-48, 1995.

ARAÚJO, F.D. de. **The ecology, ethnobotany and management of *Caryocar brasiliense* Camb. Around Montes Claros, MG, Brazil**. 1994. 175p. Thesis (Doctor in Plant Sciences) – University of Oxford, Oxford.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H. de; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.17, p. 385-396, 2004.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.de. **Análise de carotenóides em alimentos brasileiros por** Documentos, IAC, Campinas, 85.

AZEVEDO-MELEIRO, R., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Optimization of HPLC quantification of carotenoids in cooked green vegetables - Comparison of analytical and calculated data. **Journal of Food Composition and Analysis**, Roma, v. 17, n. 1, p. 37-51, 2004

BAPTISTA, J.A. **Cinética de Absorção de NH₄⁺, Efluxo de Prótons e Partição de N em Arroz**. 2002. 107p. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciências do solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2002.

BARBOSA, R. C. M. V.; AMANTE, E. R. Farinha da casca do pequi (*Caryocar brasiliense*). 28 Aspectos Agronômicos e de Qualidade do Pequi In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. **Anais...** Belém: SBF, 2002. 1CD-ROM.

BARRADAS, M. M. Informações sobre floração, frutificação e dispersão do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb. - Caryocaraceae). **Ciência e Cultura**, v. 24, n.11, p.1063-1068, nov. 1972.

BARRADAS, M.M. Informações sobre a floração, frutificação e dispersão do piqui (*Caryocar brasiliense* Camb.) (Caryocaraceae). **Ciência e Cultura**, v. 24, p. 1063-1068, 1972.

BENCHIMOL, L.L. **Genes candidatos de potencial econômico**. 2008.

BENDER, D. A. As vitaminas. In: GIBNEY, M. J.; VORSTER, H. H.; KOK, F. J. (Ed.). **Introdução à nutrição humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. cap. 8, p.114-161.

BERKALOFF, A.; BOURGUET, J.; FAVARD, P.; GUINNEBAULT, M. **Biologia e fisiologia celular**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 1975, 287p.

BINNECK, E.; NEDEL, J.L.N.; DELLAGOSTIN, O.A. Análise de RAPD na identificação de cultivares: uma metodologia útil? **Revista Brasileira de Sementes**, v.24, p.183-196, 2002.

BLAKESLEE, H., AVERY, A.G. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. **Journal of Heredity**, Washington, v. 28, p.393-411, 1937.

BRANDÃO, M.; LACA-BUENDÍA, J.P.; MACEDO, J.F. **Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002, 528p.

BRASIL. Ministério da Indústria e do Comércio. Secretaria de Tecnologia e Indústria. Coordenadoria de Informações Tecnológicas. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais**. Brasília, DF, 1985. p.161.

BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; CUADRADO, A.; BRAMMER, S.P.; BENKO-ISEPPON, A. M.; GUERRA, M. 2005. Molecular cytogenetic characterization of parental genomes in the partial amphidiploid *Triticum aestivum* x *Thinopyrum ponticum*. **Genetics and Molecular Biology**, 28 (2): 308-313

BRASILEIRO-VIDAL, A. N.; GUERRA, M. Citogenética molecular em cereais. In: BRAMMER, S. P.; IORCZESKI, E. J. (Org.). **Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. p. 277-298.

BUI, C.B.; LANG, N.T. 2004. **Molecular Genetics**. Nông Nghiệp Publisher, Ho Chi Minh, Vietnam. breeding of the genus. In: GUTTENBERGER, H. et al. **Cytogenetic studies of forest trees and shrubs - Review, present status and outlook on the future**. Zvolen: Arbora , 2000. p.181-190

BURKHOLDER, G.D.; DUCZEK, L. The effect of the chromosome banding techniques on the histone and nonhistone proteins of isolated chromatin. **Can. J. Biochem.**, v.60, p. 328-337, 1982.

BURNS, G. W. **Genética uma introdução à hereditariedade**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1986, 558p.

BURSTIN J, G DENIOT, J POTIER, C WEINACHTER, G AUBERT, A BARANGER. 2001. Microsatellite polymorphism in *Pisum sativum*. **Plant Breeding** 120:311-317.

CAIXEIRO, A.P.A. **Caracterização citogenética da heterocromatina constitutiva e sua implicação na evolução do cariótipo de espécies do gênero *Plebéia* (Hymenoptera: Apineae: Meliponini)**. Viçosa, M.G: UFV, 1999. 68p. (Dissertação – Mestrado em Genética e Melhoramento).

CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula 2001**. São Paulo: Ed. Manole, 2001, 287p.

CARVALHO, M. C.; BURGER, O. N. **Contribuição ao estudo do pequi de Brasília**. Brasília, DF: SPS,1960. 15 p. (Coleção Estudo e Pesquisa Alimentar, 50).

Caryocar villosum. **Food Research and Technology**, v. 204, p. 442-444, 1997. 30 Aspectos Agronômicos e de Qualidade do Pequi.

CASTRO, A. A. J. F. Características da vegetação do Meio Norte. In: SIMPÓSIO SOBRE

CHÉVES POZO, O.V. **O pequi (*Caryocar brasiliense*): uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do cerrado do Norte de Minas Gerais.** 1997. 100p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

COMISSÃO ESTADUAL DE PLANEJAMENTO AGRÍCOLA. **Experimentos integrados para desenvolvimento da cultura do pequi e seu aproveitamento industrial:** relatório de pesquisa. Teresina, 1984. 17 p.

COOPERATIVA faz sucesso com polpas. **Panorama Brasil.** Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=3662>. Acesso em: 22 out. 2006.

CORNER, E.J.H. **The seeds of dicotyledons.** Cambridge: Cambridge university, 1979. v.1, 311p.

COUTINHO, A. C. Monitoramento de áreas de cerrado através da utilização de técnicas cromatografia líquida de alta eficiência – espectrometria de massas. 2003. 246 f. Tese.

DATSON, P.M.; MURRAY, B.G. The use of in situ hybridization to investigate plant chromosome diversity. In: SHARMA, , A.K.; SHARMA, A. **Plant genome – biodiversity and evolution.** Enfield: Science Publishers, 2003. cap. 11, p. 297-318.

DE FRUTICULTURA, 9., 1987. Campinas, **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1988. v. 2, p. 653-657.
de Lavras, Lavras.

de Minas Gerais. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 5. Campinas. **Livro de resumos...** Campinas: SBCTA, 2003. 1 CD-ROM.

de sensoriamento remoto e geoprocessamento. In: SIMPÓSIO SOBRE OS CERRADOS DO MEIO NORTE. 1., 1997, Teresina. **Cerrados**: uma benção para a natureza: anais. Teresina: EMBRAPA-CPAMN, 1997. p.17 19.

DE WET, J.M.J. Origins of polyploids. In: LEWIS, W.H. **Polyploidy: biological relevance**. New York: Plenum. 1980. p. 3 -15.

DEWEY, D.R. Some applications and misapplications of induced polyploidy to plant breeding. In: LEWIS, W.H. **Polyploidy: biological relevance**. New York: Plenum. 1980. p. 445 -469.

DOMBROSKI, J. L. D. Estudos sobre a propagação do pequizeiro (*Caryocar brasiliense*)

DRETS, M. Una saga citogenética: el descubrimiento de los métodos de bandeado cromosómico. Significado y proyección bio-médica. **Revista Médica del Uruguay**, v. 18, p. 107-121, 2002.

EL-DASH, A.; CABRAL, I. C; GERMANI, R. **Tecnologia de farinhas mistas**: uso de farinha mista de trigo e soja na produção de pães. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA; Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1994. v. 3.

EVANS, G.M. Polyploidy and crop improvement. **Journal of the Agricultural Society of Wales**, Aberystwyth, v. 62, p. 93- 116, 1981.

FACIOLI, N. L.; GONÇALVES, L. A. G. Modificação por via enzimática da composição

FALEIRO, G.F.; RAGAGNIN, V.A.; SCHUSTER, I.; CORRÊA, R.X.; GOOD-GOD, P.I.; BROMMONSHENKEL, S.H.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 59-66, 2003.

fenológicos de espécies nativas do Cerrado. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 32., 1982. Teresina, **Anais...** Teresina: Sociedade Botânica do Brasil, 1982. p. 141-156.

FERREIRA, F. R.; BIANCO, S.; DURIGAN, J.F.; BELINGIERI, P.A. Caracterização física e química de frutos maduros de pequi. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., 1987, Campinas, **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1988. v. 2, p. 643-646.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. 1995. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2a. ed. Brasília, EMBRAPA/CENARGEN, 220 pp.

FRANCO, G. **Tabela de composição química de alimentos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1992. 307p.

FRANCO, L. M. L.; UMMUS, M. E.; LUZ, R. A. A distribuição do pequi (*Caryocar brasiliense*) na estação ecológica de Itirapina, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GEÓGRAFOS, 6, 2004, Goiânia. **Caderno de resumos...** Goiânia: AGB, 2004. p. 253.

FRITSCH, P.; RIESEBERG, L. H. 1996. The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: Smith, T. B. & Wayne, R. K. (Ed.). **Molecular genetic approaches in conservation**, New York: Oxford University Press, pp. 54-73.

FUKUI, K.; NAKAYAMA, S. **Plant chromosomes: laboratory methods**. CRC Press, U.S.A., 1996. 274p.

FURLEY, P.A.; RATTER, J.A. 1988. Soil resources and plant communities of central Brazilian cerrado and their development. **Journal of Biogeography** **15**: 97-108.

GIACOMETTI, D. C. Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTEIRAS NATIVAS, 1992, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMPF, 1993. p.13-27.

GIANNONI, M.L.; LUI, J.F. Citogenética e sua aplicação na seleção de reprodutores eqüinos. UNESP, Jaboticabal, 1988. 31p.

GLOBO RURAL. Nova fonte de combustível. Disponível em: <<http://www.todafruta.com>>.

GOMES, J. V. F.; VILAS BOAS, E. V. de B.; DE PAULA, N. R. F.; RODRIGUES, L. J. [br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=4433](http://www.todafruta.com/mostra_conteudo.asp?conteudo=4433)>. Acesso em: 25 out. 2006.

GRANT, V. **Plant speciation**. New York: Columbia University Press, 1971. 435 p.
GRIBEL, R. **Ecologia da polinização e da dispersão de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) na região do Distrito Federal, Brasília**. 1986. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília.

GUERRA M (2004) **FISH Conceitos e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: SBG, 184p.

GUERRA M. 2000b. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology** **23**: 1029-1041.

GUERRA, M. 2000a. Chromosome number variation and evolution in Monocots. Pp. 127-136. In: K.L.Wildon; D.A. Morrison (Eds.). **Monocots: systematics and evolution**. CSIRO, Melbourne.

GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral**. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 1988. 142p.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos**. Ribeirão Preto: Ed. Funpec, 2002, 131p.

HARLAN, J. R. **Crops & man**. Madison: American Society Agronomy, 1975. 287 p.

HASTEROK, R.; MARASEK, A.; DONNISON, I. S.; ARMSTEAD, I.; THOMAS, A.; KING, I. P.; WOLNY, E.; IDZIAK, D.; DRAPER, J.; JENKINS, G. Alignment of the genomes of *Brachypodium distachyon* and temperate cereals and grasses using bacterial artificial chromosome landing with fluorescence in situ hybridization. **Genetics**. v.173, p.349-362, 2006.

HERINGER, E. P. Pequiizeiro (*Caryocar brasiliense* Cambess). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BOTÂNICA DO BRASIL, 11., 1960, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Instituto Agronômico de Minas Gerais, 1962. p. 113-118.

HIANE, P. A.; RAMOS FILHO, M. M.; BARROCAS, G. E. G. Teores de minerais de alguns frutos do Estado de Mato Grosso do Sul. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**. Campo Grande, v.10, n. 2, p. 209-214, 1992.

HILU, K. W. 1993. Polyploidy and the evolution of domesticated plants. **American Journal of Botany**, St. Louis, v.80, p. 1494-1499. 1993.

HU, X.; BIDNEW, D.L.; YALPANI, N.; DUVICK, J.P.; CRASTA, O.; FOLKERTS, O.; LU.G. 2003. Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxidase generation oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. **Plant Physiol.** 133:170-181.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2000, 352p.

KAVALCO, K. **A citogenética**. Disponível em: <http://www.biociencia.org.com.br> Acesso em 20 de mar. 2004.

KERR, W.E.; SILVA, F.R.da.; TCHUCARRAMAE, B. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). informações preliminares sobre um pequi sem espinhos no caroço. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 29, p.169-171, 2007.

KIPLING, D. **The telomere**. Oxford University Press, U.S.A., 1995. 208p.

LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; LEMOS FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. 2001. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. **Molecular Ecology**, **10**: 1143-1152.

LANG, N.T.; XA, T.T.T.; YEN, H.P.; KHAC, T.T. GENETIC DIVERGENCE ANALYSIS ON Cucumis spp. BY RAPD MARKER **Omonrice** 15: 46-53 (2007)

LANZA, L.L.B.; SOUZA, Jr., C.L.; OTOBONNI, L.M.M; VIEIRA, M.L.C.; SOUZA, A.P. 2000. Genetic distance in inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics** 94: 1023-1030.

LEITCH, I.J., BENNET, M.D. Polyploidy in angiosperms. **Trends in Plant Science**, Oxford, V. 2, p. 470-476. 1997.

LEWIS, W.H. **Ploidy: biological relevance**. New York: Plenum. 1980b. p. 241-267.

LONDE, L.N. **Indução de respostas morfogênicas em *Anacardium humile* St. Hill (Anacardiaceae) e análise da divergência genética entre populações**. 2005. 140p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

LONGLEY, A.E. Polycary, polyspory and ploidy in Citrus and Citrus relatives. Jour. Wash. Acad. Sci. 15: 347-351. 1925.

LOPES, P.S.N.; SOUZA, J.C. de; REIS, P.R.; OLIVEIRA, J.M.; ROCHA, I.D.F. Caracterização do ataque da broca dos frutos do pequizeiro. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 25, p. 540-543, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2000. v. 1, 368 p.

LYNCH, M.; MILLIGAN, B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology** 3: 91–99.

MACEDO, J. F. **Pequi**: do plantio à mesa. Belo Horizonte: EPAMIG, 2005. 44 p. (Boletim

MARX, F.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. Chemical composition of the fruit pulp of

MELLO, M. L. S. Nucléolo. In: CARVALHO, H. F; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula 2001**. Campinas: Ed. Manole 2001.p 101-110.

MELO JÚNIOR, A. F.de. **Variabilidade genética em populações naturais de pequizeiro** (*Caryocar brasiliense* Camb.) caracterizada por meio de isoenzimas. 2003. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MELO, J. T. de. **Fatores relacionados com a dormência de sementes de pequi** (*Caryocar brasiliense* Camb.). 1987. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior Luiz de Queiroz, Piracicaba, Piracicaba.

MELO-JÚNIOR, A.F.; CARVALHO, D.; PÓVOA, J.S.R.; BEARZOTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia Forest Alis**, 2004. n. 66, p. 56-65.

MESQUITA, E. C. **Citologia, histologia e embriologia**. São Paulo: Ed. E.P.U., 1981, 134p. (Coleção: Série Currículo de Estudos de Biologia).

MESSMER, M.M.; MELCHINGER, A.R.; HERMANN, R.R.; BOPPERNMAIER, J. Relationships among early European maize inbreeds: I. Comparasion of pedigree and EFLP data. **Crop Science**, v.33, p. 944-950, 1993.

MIRANDA, J. de S.; OLIVEIRA FILHO J. L. **Fenologia e produção do piqui** (*Caryocar sp*) em região de ocorrência natural da espécie no estado do Piauí. Teresina: EMBRAPA-UEPAE: Teresina, 1990. 4 p. (EMBRAPA – UEPAE DE TERESINA. Pesquisa em Andamento, 51).

MONTELEONE, I.; FERRAZZINI, D.; BELLETI, P. Effectiveness of Neutral RAPD Markers to Detect Genetic Divergence between the Subspecies *uncinata* and *mugo* of *Pinus mugo* Turra **Silva Fennica** 40(3), 2006.

MORAES, A. P. Utilização de marcadores cito-moleculares na identificação de cromossomos mitóticos em *Citrus* e *Poncirus*. 2007. 143 f. Tese (Doutorado em

NASCIMENTO, V. M.; XAVIER, A. A.; CORRÊA, L. S.; VALERIO FILHO, W. V. Physical and chemical characteristics of fruit of native's species on the Brazilian cerrado. **Acta Horticulture**, v. 370, p.113-116, 1995.

NOVA fonte de combustível. Globo Rural. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=4433> Acesso em: 25 out. 2006.

O PODER de cura dos frutos. Disponível em: http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=6682. Acesso em: 23 out. 2006. RAMOS, M. I. L.; UMAKI, M. C. S.; HIANE, P. A.;

OHMIDO, N. FUKUI, K. Cytological studies of African cultivated rice, *Oryza glaberrima*. **Theor. Appl. Genet.**, v.91, p. 2132-217, 1995.

OLIVEIRA, K. A. K .B. de. **Variabilidade genética entre e dentro de populações de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb)**. 1998. 92 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

OLIVEIRA, M. N. S.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; GUSMÃO, E. Estádios de maturação dos frutos e fatores relacionados aos aspectos nutritivos da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). In: CONGRESSO NACIONAL, 55; ENCONTRO REGIONAL DE BOTÂNICOS DE MG, BA e ES, 26., 2004, Viçosa. **Livro de resumos...** Viçosa: SBB, 2004. 1CD-ROM.

OLIVEIRA, S. de. **Pequi**. Globo Rural, São Paulo, v. 4, n.38, p. 80-83, nov./dez. 1988. OURO do Cerrado. **Minas Faz Ciência**, n. 27, p. 38-41, set./nov. 2006. **COOPERATIVA faz sucesso com polpas**. Panorama Brasil. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=3662>. Acesso em: 22 out. 2006.

OS CERRADOS DO MEIO NORTE, 1., 1997, Teresina. **Cerrados**: uma benção para a natureza: anais. Teresina: EMBRAPA-CPAMN, 1997. p. 45-56.

OSBORN, T.C.; PIRES, J.C.; BIRCHLER, J.A. et al. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics*, **Oxford**, v. 19, p.141-147. 2003.

OTTO, S.P. In polyploids, one plus one does not equal two. **Trends in Ecology and Evolution**, Oxford, v. 18, p. 431-433. 2003.

OZKAN, H.; TUNA, M.; ARUMUGANATHAN, K. Nonadditive changes in genome size during allopolyploidization in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. **Journal of Heredity**, Washington, v. 94, p. 260-264. 2003.

PAIVA, H. **Núcleo – A central de inteligência da célula**. Disponível em:<http://www.caradebiologia.com.br> Acesso em: 26 de abr. 2005.

PARDUE, M. L.; GALL, J. G. Molecular Hybridization to radioactive DNA to the DNA of cytological preparations . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 61, p. 600-604, 1969.

PASSOS, X. S.; SANTOS, S. da C. FERRI, P. H.; FERNANDES, O. de F.L.; PAULA, T. de F.; GARCIA, A. C. F.; SILVA, M. do R. R. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 623-627, nov./dez. 2002. Aspectos Agronômicos e de Qualidade do Pequi 31.

PEIXOTO, A. R. O pequi e a lavoura no Cerrado. In: PEIXOTO, A. R (Ed.). **Plantas oleaginosas arbóreas**. São Paulo: Nobel, 1973. p. 197-226.

pequizeiros (*Caryocar brasiliense* Camb.) na região Sudeste do Estado de Goiás. 2002.

PEREIRA, A. V.; SALVIANO, A.; PEREIRA, E. B. C.; SILVA, J. A. da; SILVA, D. B. da; JUNQUEIRA, N.T.V. **Pequi**: produção de mudas. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2000. 2 p. (Embrapa Cerrados. Recomendações Técnicas, 1)

PESCE C. **Oleaginosas do Amazonas**. [S. l: s. n.], 1941.

PFLIEGER, S.; LEFEBVRE, V.; CAUSSE, M. (2001) The candidate gene approach in plant genetics: a review. **Mol Breed** 7:275-291.

PHAM, T.B.T.; LANG, N.T.; BUU, B.C. 2003. Soybean genetic diversity analysis. **OMonRice** 11:138-141.

PHUONG, P.L.D. 2003. Agronomic traits and genetic diversity analysis of cucumber genotypes. **BSc. Theme**. Nong Lam University, Ho Chi Minh, Vietnam.

PINTO, J.R.R.; OLIVEIRA-FILHO, A.T. Perfil florístico e estrutura de uma floresta de vale no Parque Nacional da Chapada dos Guimarães, Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.22, n.1, p.53-67, 1999.

POZO, O.V.C. **O pequi (*Caryocar brasiliense*): uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do cerrado no norte de Minas Gerais**.1997. 100f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

POZZOBON, M.T.; VALLS, J.F.M. 2003. Chromosome number in Brazilian germoplasm accessions of *Paspalum hydrophilum*, *P. modestum* and *P. palustre* (Gramineae; Paniceae). **Genetics and Molecular Biology** 26: 365-368.

RAMALINGAM, J.; VERA CRUZ, C.M.; KUKREJA, K.; CHITTOOI, J.M.; WU, S.L.; BARAIDAN, M.R.; GEORGE, M.L.; COHEN, M.; HULBERT, S.; LEACH, J.E.; LEUNG, H. 2003. Candidate resistance genes from rice, barley, and maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice. **Mol. Plant. Microbe Interact.** 16:14-24.

RAMANNA, M.S. The use of 2n gametes in breeding polysomic polyploid species: some achievements and perspectives. In: MARIANI, A.; TAVOLETTI, S. **Gametes with somatic chromosome number in the evolution and breeding of polyploid polysomic species: achievements and perspectives**. Perugia: Forage Plant Breeding Institute, 1992. p. 91-99.

RAMOS FILHO, M. M. Efeito do cozimento convencional sobre os carotenóides pró-vitamínicos "A" da polpa do piqui (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Boletim do CEPPA**. Curitiba, v.19, n.1, p. 23-32, jan./jun. 2001.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.W. Neopolyploidy in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.33, p. 589 -639. 2002.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.W. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.29, p.467- 501. 1998.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F. Biodiversity of the flora of the Cerrado. In: SIMPÓSIO nitrogênio, fósforo e potássio em folhas e frutos de piqui. In: CONGRESSO BRASILEIRO

RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F.; BRIDGEWATER, S. 1997. The brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany 80**: 223-230.

RIBEIRO, A.E. O espaço, o homem e o seu destino no norte de Minas. In: Universidade Federal de lavras. Departamento de Administração e Economia. **Manejo sustentado do cerrado para uso múltiplo**: subprojeto agroecologia e desenvolvimento. Lavras, 1996. p. 89-152.

RIBEIRO, J. F.; GONÇALVES, M. I.; OLIVEIRA, P. E. A. M.; MELO, J. T. de. Aspectos triglicéridica do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). **Química Nova**, v. 21, n.1, p.16-19, 1998. Aspectos Agronômicos e de Qualidade do Pequi
29

RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado, p.89-166. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. **Cerrado**: ambiente e flora. Planaltina. EMBRAPA-CPAC, 1998. xii + 556p.

RIESEBERG, L.H. Polyploid evolution: keeping the peace at genomic reunions. **Current Biology**, London, v. 11, p. 925- 928. 2001.

RIZZINI, C.T. A flora do cerrado. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, 2., 1963, São Paulo. **Anais...** São Paulo: EDUSP, 1963. p.125-177.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Nature and distribution of carotenoids in foods. In: Charalambous G. (Ed.). **Shelf-life studies of foods and beverages**: chemical, biological, physical and nutritional aspects. Amsterdam: Elsevier, 1993. p.547-589.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M. **HarvestPlus handbook for carotenoid analysis**. Washington, DC: International Food Policy Research Institute, 2004, 57 p. (HarvestPlus Technical Monography, series 2).

ROGATTO, S. R.; RAINHO, C. A. Citogenética molecular. In: ROGATTO, S. R. (Org). **Citogenética sem risco: Biossegurança e garantia de qualidade**. 1ª ed. Ribeirão Preto: Funpec, 2000. p. 133-152.

ROSETTO, M. J.; MCNALLY, R.J.; HENRY. 2002. Evaluating the potential of SSR flanking regions for examining taxonomic relationships in the Vitacea. **Theor Appl Genet** 104:61-66.

SACCHET, A. M. O. F. Variabilidade genética: ponto de partida para o melhoramento de plantas. In: SACCHET, A. M. O. F. (Org.). **Genética para que te quero?** Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1999. p. 99-104.

SALVIANO, A.; GUERRA, A.F.; GOMES, A.C. Avaliação agronômica do pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. **Anais...** Belém: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2002. 1CD-ROM.

SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. **Cerrado**: ambiente e flora. Planaltina. EMBRAPA-CPAC, 1998. xii + 556p.

SANTANA, J. das G. **Caracterização de ambientes de cerrado com alta densidade de**

SANTI-RAMPAZZO, A. P.; NISHIYAMA, P.B; FERREIRA P.E.B; SANTOS, I. C. M. . Intrapopulation polymorphism of nucleolus organizer regions in *Serrapinnus notomelas* (Characidae, Cheirodontinae) from the Parana River. **Journal of Fish Biology**, v. 72, p. 1236-1243, 2008

SANTOS, B. R. **Micropropagação do pequiheiro** (*Caryocar brasiliense* Camb.). 2004. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SANTOS, B.R.; PAIVA, R.; DOMBROSKI, J.L.D.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R.C.; SILVA, A.A.N. **Pequiheiro** (*Caryocar brasiliense* Camb.): uma espécie promissora do cerrado brasileiro. http://www.editora.ufla.br/Boletim/pdf/bol_64.pdf. Accessed on: 3 Sept. 2007.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; CARDOSO, M. B.; BOFF, T.; SIMIONI, C. Chromosome numbers and unreduced gametes in species of *Leucaena* Benth (Leguminosae) – new contributions for the taxonomy, evolutionary studies and

SHARMA, A.K.; SHARMA, A. Preparation of material for analysis of chromosome at structural fluorochromes. In: **Plant Chromosomes**. HAP, Amsterdam, Holanda, 1999. 371p.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p.1315S-1321S, 1995.

SILVA, D. B. da.; JUNQUEIRA, N. T. V.; SILVA, J. A. da; PEREIRA, A. V.; SALVIANO, A.; JUNQUEIRA, G. D. Avaliação do potencial da produção do “pequizeiro-anão” sob condições naturais na região sul do Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 726-729, dez. 2001.

SILVA, J. A. da. **O cultivo do pequizeiro**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 2 p. (EMBRAPA-CPAC. Guia Técnico do Produtor Rural, 10).

SILVA, R. F. da; CARVALHO, J. E. U. de; MÜLLER, C. H. Biometria e composição centesimal de frutas da Amazônia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18., 2004, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2004. p.22-26.

SOBRE O CERRADO, 8.; INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL SAVANNAS, 1., 1996, Brasília, DF. **Biodiversidade e produção sustentável de alimentos e fibras nos Cerrados**: anais. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1996. p. 3 5.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. **Trends in Ecology and Evolution**, Oxford, v.14, p. 348-352. 1999.

SOUSA, C.S. **Avaliação da germinação, resistência à septoriose e introdução ao estudo molecular da alface (*Lactuca sativa* L). cv. Uberlândia.** 2002. 90p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Ubelândia.

SPOONDER D; VAN TREUREN R; DE VICENT MC 2005. Molecular markers for genebank management. *IPGRI*. Disponível em <http://www.ipgri.cgiar.org/publications/pdf/1082.pdf>. Acessado em 20 de fevereiro de 2007 (Technical Bulletin No. 10)

STEBBINS, G.L. **Chromosomal evolution in higher plants.** Reading: Addison-Wesley, 1971. 216 p.

STEBBINS, G.L. **Chromosomal evolution in higher plants.** Reading: Addison-Wesley, 1971. 216 p.

STEBBINS, J.L. 1980. Polyploidy in plants: unsolved problems and prospects. In: LEWIS, W.H. **Polyploidy: biological relevance.** New York: Plenum. 1980. p. 495-519.

STUESSY, T.F. 1990. Plant Taxonomy: The systematic evolution of comparative data. University Press, New York, 450 p.

SUMNER, A.T. **Chromosome banding.** Unwin Hyman, London, 1990. 434p.

SYBENGA, J. **Cytogenetic in plant breeding.** Springer-Verlag, Berlin, 1992. 469p.

SZMIDT, A.E., Wang, X.R. & Lu, M.Z. 1996. Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* (L.) using haploid tissue analysis. **Heredity** 76: 412-420.

THERMA, E.; SUSMAN, M. Human chromosomes. Structure, behavior and effects. Springer-Verlag, Germany. 1992. 376p.

TRINDADE, M. da G., CHAVES, L. J., VELOSO, R. N., BORGES, J. D. Variabilidade genética entre progênies e subpopulações de caracteres do fruto e da semente de pequi USP. Agência USP de Notícias. **Laboratório testa biodiesel com óleos de plantas brasileiras em veículos e locomotivas**. São Paulo, 12/12/2003 - Boletim nº 1336. Disponível em: <<http://www.usp.br/agen/bols/2003/rede1336.htm#primdestaq>> Acesso em: 5 set. 2005.

VARSHNEY, R. K.; TUBEROSA, R. (Eds.) **Genomics-Assisted Crop Improvement**. 2007, vol 1: 386 p., Hardcover.

VERMA, R.S.; BABU, A. Banding techniques. In: **Human chromosomes Principles and techniques**. International ed., U.S.A., 1995. 419p.

VILELA, G. F. **Variações em populações naturais de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae): fenológicas, genéticas e de valores nutricionais de frutos**. 1998. 88 p. Dissertação (Mestrado Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

VILELA, G. F.; ROSADO, S. C. S. R.; GAVILANES, M. L.; CARVALHO, D. Variação intra e interpopulacional em pequi – *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae). I. Carotenóides. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ECOSSISTEMAS FLORESTAIS, 4., 1996,

WALKER, M. R.; RAPLEY, R. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. São Paulo: Ed. Atheneu, 1999, 334p.

WENDEL, J.F. Genome evolution in polyploids. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 42, p. 225-249. 2000.

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

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

WOLFE, K.H. Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. **Nature Reviews Genetics**, New York , v.2, p. 333-341. 2001.

CAPÍTULO II

MARCADORES RAPD EM POPULAÇÕES DE PEQUI SEM ESPINHO E COM ESPINHO NO CAROÇO

Resumo

O pequi, *Caryocar brasiliense*, é uma das espécies de destaque no bioma do Cerrado devido a sua utilização na culinária, medicina popular, indústria e siderurgia. Apresenta índice de exploração elevado, podendo entrar na lista das espécies ameaçadas de extinção. Na região de São José do Xingu (MT) foi encontrada uma árvore produzindo pequi sem espinho no endocarpo, o que levantou a possibilidade de melhorar o pequi para consumo aproveitando a alta apreciação que já possui. Com o objetivo de analisar as diferenças genômicas entre o pequi com e o sem espinho no endocarpo, utilizou-se marcadores RADP (Random Amplified Polymorphism DNA). As bandas polimórficas geradas foram isoladas, clonadas e seqüenciadas, buscando identificar sequências responsáveis pela alteração fenotípica. Observou-se que o pequi sem espinho fica isolado geneticamente das demais populações de pequi com espinho no caroço, comprovando que essa característica está relacionada à divergência genética da espécie. Análises em BLASTn mostraram a similaridade aos genes Dof1 de *Zea mays*, na população com espinho e com o gene da Acetiltransferase Fosfinotricina de *Z. mays*, na população sem espinho. As análises em BLASTx revelaram similaridade com as proteínas responsáveis pela Deficiência em Redutase Férrica 4, no pequi sem espinho e com catalase, no pequi com espinho.

Termos de indexação: *Caryocar brasiliense*, pequi, espinho, RAPD, caroço

Abstract

Pequi, *Caryocar brasiliense*, is one of the species of highlight at the biome of the *Brazilian savannah* due to its utilization in culinary, popular medicine, industry in general, and iron and steel industry. It presents an elevated index of exploration, being capable of entering the list of the endangered species. In the region of São José do Xingu (MT), a tree of *pequi* without thorn at the mesocarp was found and this enables to improve *pequi* not only for consumption, taking advantage of the high appreciation it already has. To detect the existing genomic differences between the *pequi* with and without the thorn at the endocarp, RADP markers were utilized. The generated polymorphisms were cloned and sequenced in order to identify the sequences responsible for the phenotypical alteration. It was observed that the *pequi* without thorn is genetically isolated from the other populations of *pequi* with thorn at the endocarp, proving that this characteristic is related to the genetic divergence of the species. Analysis in BLASTn evidenced the similarity of the Dof1 genes of *Zea mays*, in the population with thorn, and in the population without thorn, with the gene of phosphotricin acetyl transferase of *Z. mays*. In the analysis of BLASTx, the similarity was verified with the proteins responsible for the deficiency in ferric reductase 4, in the *pequi* without thorn and catalase, in the *pequi* without thorn.

Indexation terms: *Caryocar brasiliense*, *pequi*, thorn, RAPD.

Introdução

Caryocar brasiliense Cambess. (Caryocaraceae), pequi, é uma das espécies que têm se destacado no bioma do Cerrado (Figura 1). É uma frutífera de grande importância na região Norte de Minas, Brasil, onde o extrativismo dos seus frutos é de grande relevância para a alimentação do sertanejo, além de constituir-se em fonte de renda (Araújo, 1995; Pozo, 1997; Alencar, 2000) (Figuras 2 A e 2 B).

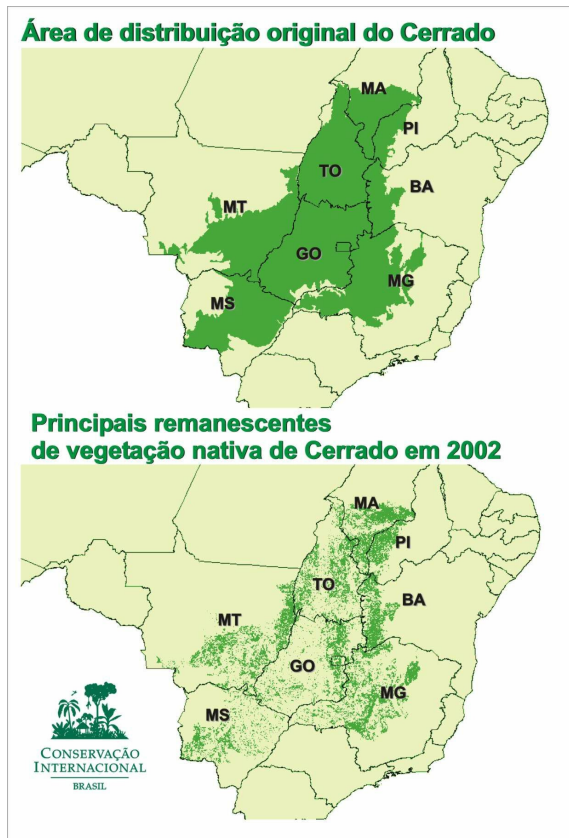


Figura 1: Regiões de Cerrado no Brasil (em verde) com ocorrência de *Caryocar brasiliense* Cambess. Fonte: www.unb.com.br

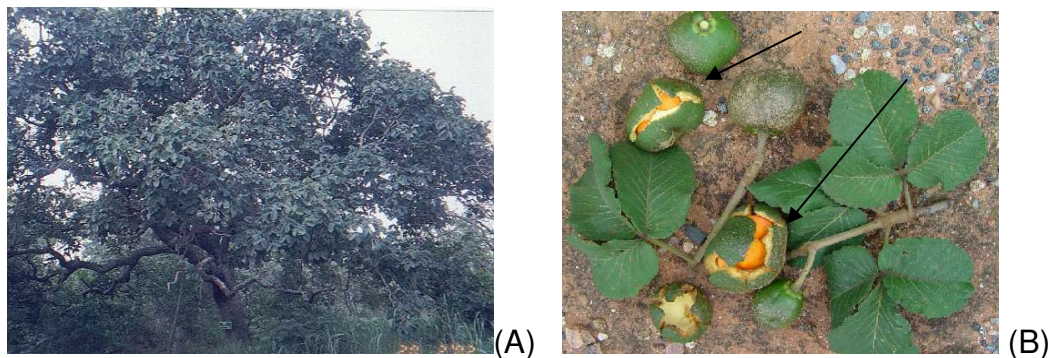


Figure 2- Pequi (Caryocar brasiliense). (A) Planta adulta (B) Detalhe do fruto (setas). Fonte: Kerr et al., 2007.

Essa espécie tem se destacado pelo uso de seus frutos (mesocarpo) na alimentação humana, por meio do preparo de pratos típicos, condimentos, óleos e bebidas adocicadas (Barradas, 1972, 1973; Corner, 1976, Almeida; Silva, 1994; Araújo, 1994; Lopes *et.al*, 2003, Santos *et al.*, 2006). É considerada fonte de vitaminas A e C, tiamina, proteínas e sais minerais, apresentando elevados teores de carotenóides; utilizada, ainda, na extração de óleos para a fabricação de cosméticos (Almeida *et al*, 1998). Na medicina popular, é utilizado para tratamento de problemas respiratórios e oftalmológicos, contra bronquites, gripes, resfriados e no controle de tumores (Almeida; Silva, 1994). É considerado afrodisíaco e suas folhas são adstringentes e estimulam a produção de bÍlis (Almeida; Silva, 1994; Ribeiro, 1996; Brandão *et al.*, 2002; Kerr *et al.*, 2007). A casca além de ser utilizada em curtume, é tintorial (Brandão *et al.*, 2002). Sua madeira é de ótica qualidade e alta resistência (Almeida; Silva, 1994) e fonte de carvão para siderurgias (Ribeiro, 1996)

A região de ocorrência do pequi abrange, aproximadamente, 2000 municípios e estima-se em cerca de 40000 coletores para vender os frutos ou os caroços (putâmens ou endocarpo) aos compradores ou atravessadores. As pequenas farmácias e curandeiros das vilas e cidades dessas regiões são procurados por aproximadamente 3000 pessoas, no período de colheita, para retirarem os espinhos deixados pelos caroços no “céu da boca” de comedores descuidados. Essa característica é o principal problema que elimina o pequi de ser

cultivado em casa e de ser considerado uma fruta de mercado (Gribel, 1986; Kerr, 2007).

Na cidade de São José do Xingu, Kerr *et al.* (2007) encontraram uma planta com frutos sem espinhos no caroço e, segundo esses autores, os caroços são carnudos, um pouco mais doces do que os que contém espinhos (Figura 3 A e 3 B).

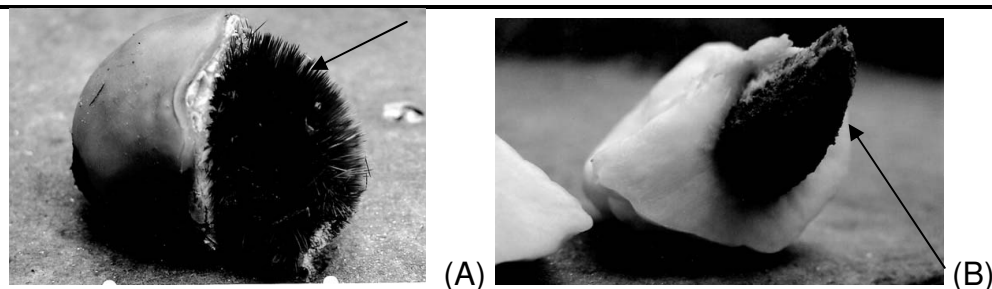


Figura 3: Comparação entre o pequi com espinho e o sem espinho no caroço. **Fonte:** Kerr *et al.* (2007)

A) Pequi com espinho no caroço. Fruto seccionado mostrando o caroço com pequenos espinhos (seta).

B) Pequi sem espinho no caroço. Fruto seccionado mostrando o caroço sem os espinhos (seta).

Essa característica nos induziu ao estudo do pequi sem espinho para, dentro de 4 a 8 anos, fazer distribuição de mudas desse pequi. Essa mutação apresenta todas as características para transformar o pequi em fruta de mercado, tanto para as populações locais quanto para os mercados regulares de frutas nacionais e estrangeiras.

Colevatti (1999) descreve vários polimorfismos entre populações de pequi com espinho, utilizando microssatélites, no entanto, a técnica de RAPD (Willian *et al.*, 1990) será utilizada nesse trabalho visto que permite discriminar polimorfismos existentes entre o indivíduo sem espinho com as populações com espinho no endocarpo em condições reais de nosso Laboratório.

Nesse trabalho, o objetivo foi identificar, por marcadores RAPD, o padrão de polimorfismo nas populações de pequi com o caroço espinhoso e sem espinho.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico e Áreas de coleta

Foram coletadas amostras de folhas expandidas e sadias de 20 indivíduos de pequi em 4 populações do Cerrado: Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia – Uberlândia (MG); zona urbana de Porto Nacional – Tocantins (TO); Fazenda Arrependidos – Corumbaíba (GO); São José do Xingu – Mato Grosso (MT) (população com espinho) e de um indivíduo de São José do Xingu – Mato Grosso (MT) (indivíduo sem espinho). As folhas foram mantidas em ultra-freezer (-80°C) no Laboratório de Genética, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia (MG – Brasil) onde, também, foi realizada a análise experimental.

Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído pelo método CTAB com modificações, segundo Doyle; Doyle (1990) utilizando “bulks” fechados de 20 indivíduos das quatro populações com espinho e um indivíduo sem espinho, com, aproximadamente, 1g de tecido vegetal.

Após homogeneização do material, os tubos contendo o DNA foram mantidos em freezer a -20°C, até o momento do uso.

A quantidade de DNA extraído foi estimada em espectrofotômetro GBC-UV/VIS911A (SONY) por leitura de absorvância a 260nm.

Bandas de DNA genômico separadas por eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) foram usadas como indicadoras da integridade do DNA extraído. A amostra quantificada e avaliada foi diluída em água milliQ para a concentração de trabalho de 5 ng/μL e mantida em freezer a -22°C.

Reação de RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA)

Para avaliar a diversidade genética dos acessos, amostras de DNA de folhas de plantas de pequi com e sem espinho foram amplificadas via PCR para a obtenção de marcadores RAPD. O RAPD apesar de ser um marcador dominante foi utilizado, nesse experimento, pois é um marcador eficiente na distinção de

polimorfismos entre as populações e essas sequências polimórficas foram clonadas e sequenciadas para a verificação dos produtos amplificados.

As reações de amplificação foram feitas em um volume de 20 µL, com 2 µL de tampão *Taq* 10X, 3 µL dNTP (4mM), 1 µL MgCl₂ (2,5 mM), 1 µL de *Taq* polimerase (1U/mL), 1 µL de *primer* (10 pmoles), 1 µL de DNA genômico (5 ng) e 11,0 µL de água milliQ. Foram utilizados 77 *primers* aleatórios dos quais 53 (Tabela 1) foram selecionados por apresentarem padrões informativos de bandas.

Tabela 1: *Primers* utilizados nas reações de PCR para obtenção de marcadores RAPD em *Caryocar brasiliense* Cambess., com caroço sem e com espinho.

<i>Primers</i>	Número de acesso	Seqüência de Nucleotídeos
APO1	1	5'CACGGTCTGAGCTGATTG CGTGTTC 3'
APO2	2	5'CCCTCCAAAATCAAGTGG 3'
APO4	3	5'AAGTGCTGTAGGCCATTT AGATTAG 3'
OPA1	4	5' CAGGCCCTTC 3'
OPA2	5	5' TGCCGAGCTG 3'
OPA3	6	5' AGTCAGCCAC 3'
OPA4	7	5' AATCGGGCTG 3'
OPA5	8	5' AGGGGTCTTG 3'
OPA7	9	5' GAAACGGGTC 3'
OPA10	10	5' GTGATCGCAG 3'
OPA11	11	5' CAATCGTCCGT 3'
OPA12	12	5' TCGGCGATAG 3'
OPA14	13	5' TCTGTGCTGG 3'
OPA15	14	5' TTCCGAACCC 3'
OPA19	15	5' CAAACGTCGG 3'
OPA20	16	5' GTTGCATCC 3'
OPF18	17	5' TTCCCGGGTT 3'
RCO01	18	5'GCGGTGACCCGGGA 3'

OPC06	19	5' GAACGGACTC 3'
OPC18	20	5' CTCACCGTCC 3'
OPI06	21	5' AAGGCGGCAG 3'
G7	22	5'AAGCCCGACGACCTCACC CGCAGTGC 3'
B2	23	5'CTCGCGCCCGGGATGAAG GTCGTCTTCCXXCCGACGT CCCAGGTC3'
AI	24	5' TCGGAGGTCAAGTCC 3'
H2	25	5'CTCTAAGCTTGTGACTCA GGCTGACAAATCAGTTGTC 3'
OPD02	26	5' TGGCCACTGA 3'
OPV3	27	5' CTCCCTGCAA 3'
OPM16	28	5' GTAACCAGCC 3'
OPW10	29	5' TCGCATCCCT 3'
OPC 13	30	5'AAGCCTCGTC 3'
OPC06	31	5' GAACGGACTC 3'
OPC18	32	5' TGAGTGGGTG 3'
OPI06	33	5' TGCCCAGCCT 3'
E2	34	5'CAGAATTCGGAA(AG)TA(G T)ATGA(AG)GGGGTC3'
CL	35	5'ACCTGCAGGCATTCTCCA GAAT 3'
MYR1	36	5'ACACTGGAACGACTGTTA CGAG 3'
MYR2	37	5'GGTAATAAGTTCACGAAT GTTTCATGG 3'
MYR3	38	5'ACAACGCTARAMTCGGAC CGATG 3'
MYR4	39	5'TCTGAGTTGTGACGTCCA TCG 3'
PRIMER 1	40	5'CCATCCACCATCTCAGCA TGATGAAA 3'
PRIMER 2	41	5'GGTTACTAGTAGTGGGTT TGCTGG 3'

PRIMER 3	42	5'TATCGGGGCCCAACCCCGA CAAT 3'
PRIMER 4	43	5'CCTTGAAGCACTTCTGGG AATCAGA 3'
PRIMER 5	44	5'CTGACCCTGCAAAGGTAG GCGTATTCACT 3'
PRIMER 6	45	5'CTCCGGTCTGAACTCAGA TCACGTAGG 3'
PRIMER 7	46	5'AAACTGGGATTAGATACC CCTACTAT 3'
PRIMER 8	47	5'GAGGGTGACGGGCGGTG TGT 3'
R3	48	5'TCGTGTATTCAAATTGGCA 3'
G7	49	5' ACGGAAGT 3'
G6	50	5' AATGCGGGCG 3'
PRIMER 2	51	5'ACAGAATTCGCTGACCAT CAATAAG 3'
PRIMER 3	52	5'TATCGGGGCCCAACCCCG ACAAT 3'
PRIMER 4	53	5'TGTTGACTGGCGTGATGT AGTTGCTTGG 3'

As amplificações foram realizadas em termociclador (MJ Research, Inc., modelo PTC-100) programado para 2 minutos a 97°C seguidos de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C; 1 minuto a 35°C; 2 minutos a 72°C e extensão final com 8 ciclos de 20 segundos a 40°C; 7 minutos a 72°C e redução para 4°C. Após a amplificação, foram adicionados a cada amostra, 2 µL da mistura de azul de bromofenol (0,25% p/v), glicerol (60% v/v) em água. O volume de 15 µL de cada amostra foi aplicado em gel de agarose 1,5%, corado com Brometo de Etídio (0,5 µg/mL) em tampão TBE 0,5X (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1mM). A separação eletroforética foi de 3 horas a 120 volts, após o que os géis foram visualizados e fotografados em Image MaterTM VDS Software (Pharmacia Bioscience) e as bandas polimórficas recortadas sob luz ultravioleta.

Purificação das bandas

As bandas polimórficas únicas, visualizadas nos *bulks*, foram recortadas do gel com auxílio de bisturi estéril e colocadas em microtubo de 1,5 ml. A purificação se deu pela eluição do DNA em microtubo com três microfuros e algodão de vidro ao fundo e centrifugação por 5 minutos a 5.000 rpm. Ao líquido centrifugado acrescentou-se 1/10 do volume de acetato de amônio 7,5M, 2 volumes de etanol 100% gelado e 10 µL de glicogênio (20mg/mL) para precipitação *overnight* a -20° C. A solução foi centrifugada por 15 minutos a 13.000 rpm, descartado o sobrenadante e o precipitado lavado com etanol 70%, centrifugado novamente a 13.000 rpm durante 5 minutos e ressuspenso em 15 µL de água milliQ.

Análise dos dados

Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas entre os diferentes *bulks*. A matriz de distância genética foi utilizada para análise de diversidade genética, por meio de dendrograma.

Foram realizadas duplicatas de cada gel e as bandas presentes em ambos os géis foram analisadas.

A matriz gerada pelo programa STATISTICA 4,5A (1993) foi usada para o cálculo das distâncias genéticas e análise de agrupamento. As distâncias genéticas foram calculadas pelo método de Percentagem de Desacordo, que é dado pela fórmula: N'_{AB}/N_T , onde N'_{AB} é o número total de bandas polimórficas entre os genótipos comparados e N_T é o número total de bandas geradas no processo.

A análise de grupos ou *clusters* foi feita pelo método não ponderado de agrupamento aos pares, utilizando médias aritméticas (UPGMA – “Unweighted pair- group method using arithmetic average”) o qual agrupa indivíduos de acordo com a similaridade (Cruz & Carneiro, 2003).

Clonagem dos fragmentos polimórficos amplificados

A clonagem dos fragmentos de interesse foi realizada com o *kit pGEM[®]-T Easy Vector Systems I* (Promega) seguindo as recomendações do fabricante.

Purificação do plasmídeo contendo o inserto

A extração do DNA plasmidial foi realizada com o *kit Perfectprep[®] Plasmid Mini* (EPPENDORF) seguindo o protocolo do fabricante.

Reação de sequenciamento em microtubos

Clones positivos foram seqüenciados em ambas direções em *MegaBace[™] 1000* (Molecular Dynamics, Amersham Life Sciences), usando o método de sequenciamento dideoxi com *primers* universais M -13 Forward ou M -13 Reverse seguindo as recomendações do fabricante.

Análise de identidade em bancos genéticos

Análise de identidade dos fragmentos seqüenciados foi realizada utilizando o banco de dados *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O programa *BLAST* (Altschul *et al.*, 1990) foi usado para o alinhamento das seqüências obtidas do pequi com outras já depositadas no banco específico de plantas.

Resultados e discussão

A qualidade do DNA obtido de cada amostra favoreceu a realização das reações de RAPD.

As bandas geradas no RAPD possibilitaram a análise da variabilidade genética existente entre as cinco populações analisadas (Figuras 4A e 4B).

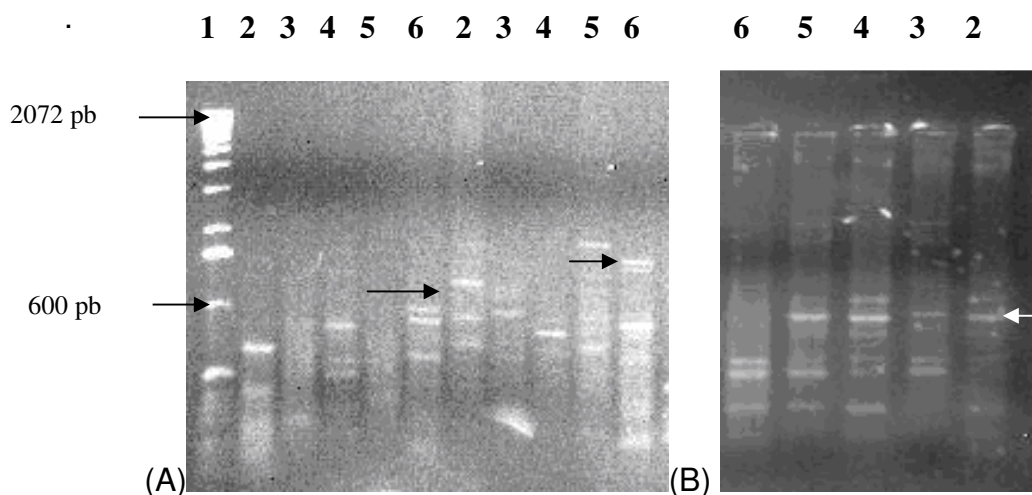


Figura 4: Produtos amplificados em pequi, *Caryocar brasiliense* Cambess., pelos *primers* de RAPD (OPA3, OPA2 e OPA7, respectivamente). A) 1- marcador (100 pb); 2 – população de Goiás; 3 – população de Minas Gerais; 4 – população de Porto Nacional; 5 – população de São José do Xingu (populações com espinho); 6 – indivíduo São José do Xingu (sem espinho) mostrando polimorfismo no pequi sem espinho (setas). B) Monomorfismo no pequi com espinho e ausência da banda detectada no pequi sem espinho (seta branca). Gel de agarose 1,5% corado com Brometo de Etídeo.

Dos 77 *primers* utilizados (Tabela 1), 53 geraram bandas informativas, que foram selecionadas para a análise dos resultados. Vinte e um *primers* (APO1, APO4, G6, G7, MYR1, MYR4, OPA1, OPA3, OPA4, OPA5, OPA7, OPA12, OPA14, OPA15, OPA19, OPI06, P2, P3, P7, P8, R3) geraram polimorfismos, que permitiram distinguir a população de pequi sem espinho da população com espinho.

Os marcadores permitiram observar a presença de bandas nas populações com espinho e sua respectiva ausência no sem espinho e, também, a presença de banda na população sem espinho, ausentes nas populações com espinho no caroço.

Os 326 fragmentos de RAPD gerados com os 53 *primers* foram submetidos à análise de *cluster*, gerando dendrograma de divergência genética entre as populações (Figura 5).

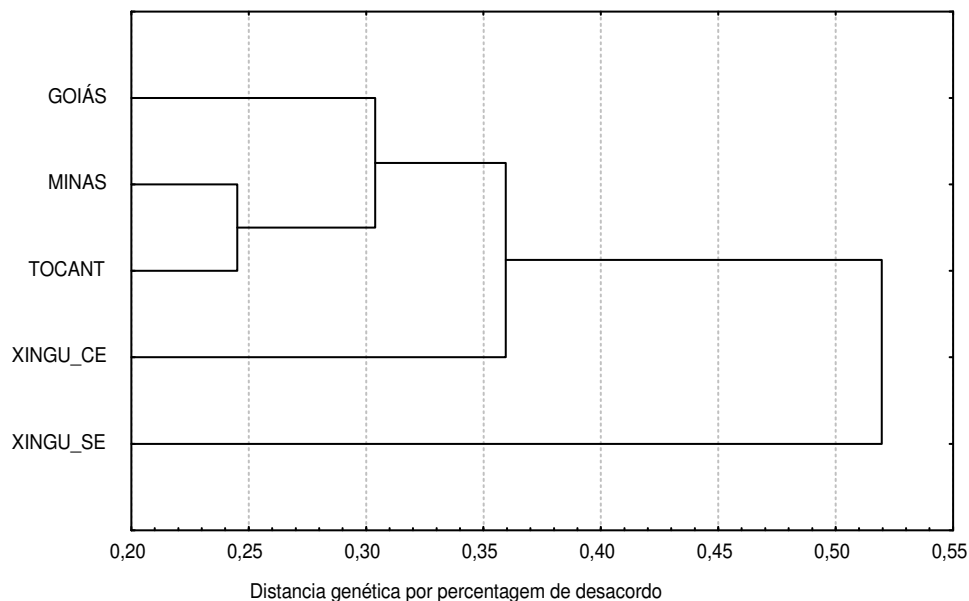


Figura 5 - Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e agrupamento pelo método de UPGMA entre 5 populações de pequi (*Caryocar brasiliense*) do cerrado brasileiro, utilizando 53 *primers*.

Goiás: Corumbaíba – GO (Fazenda Arrependidos);

Minas: Uberlândia – MG (Clube Itororó Caça e Pesca de Uberlândia);

Tocant: Porto Nacional – TO;

Xingu_CE: São José do Xingú - – MT (pequi com espinho no caroço);

Xingu_SE: São José do Xingu - Mato Grosso – MT (pequi sem espinho no caroço).

As populações de pequi com espinho, com menores divergências genéticas são as de Minas (Uberlândia – MG) e Tocantins (Porto Nacional – TO) apresentando divergência aproximada de 23% entre seus genótipos, Minas e Goiás (Corumbaíba – GO) apresentaram divergência de 30%, enquanto que essas

três regiões com a região do Xingu (população com espinho) mostraram divergência genética de, aproximadamente, 36%. A população de pequi sem espinho, da região do Xingu, ficou isolada geneticamente das demais, apresentando uma divergência de, aproximadamente, 52%.

No pequizeiro, o alto fluxo gênico e a baixa divergência entre populações podem estar relacionados ao seu sistema de polinização, que é realizada, principalmente, pelo morcego, cujo vôo atinge grandes distâncias e, também, à dispersão das sementes que é realizada por mamíferos e aves grandes (Vilela, 1998; Melo-Júnior *et al.*, 2004). Dessa forma pode-se, por meio dos locos polimórficos, estabelecer seleção assistida por marcadores em pequi com e sem espinho no caroço.

A caracterização molecular dos genótipos é uma ferramenta de grande importância para os programas de melhoramento genético, uma vez que cruzamentos entre indivíduos com maior diversidade genética contribuem para a ampliação de variabilidade em populações segregantes, possibilitando assim, ganho genético (Mesmes *et al.*, 1993; Sousa, 2002; Londe, 2005).

Apesar da alta similaridade genética entre as populações de pequi analisadas, sugere-se que a característica presença ou ausência de espinhos no caroço tenha relação com a divergência genética das populações, originada por mutação pontual ou, mesmo, por diferenças cromossômicas entre o indivíduo sem espinho e os das populações com espinho no caroço.

A seleção de bandas para purificação foi baseada nos polimorfismos detectados nas cinco populações estudadas. A clonagem e seqüenciamento dos fragmentos geraram informações sobre diferenças genéticas (polimorfismos) ou regiões conservadas (monomorfismos) entre indivíduos selecionados para a característica de ausência e presença de espinho no caroço. As seqüências dos clones foram depositados no GenBank (Acessos números ET052997 até ET 053017).

As análises por BLAST de nucleotídeos (Tabela 2) mostraram que na população com espinho no caroço, o clone ET 053010 é similar ao gene Dof1 de

Zea mays, enquanto que na população sem espinho, o clone ET053000 é similar ao gene da acetiltransferase fosfinotricina de *Z. mays*.

Tabela 2: Análise de Bioinformática (BLASTn) dos clones selecionados por RAPD em *Caryocar brasiliense* (Cambess.) com e sem espinho no caroço.

Clone (número de acesso no GenBank)	Similaridade	Nome	e-value
ET053010 População com espinho	Similar com <u>DQ490965.1</u> (<i>Zea mays</i>)	clone pGR25C22 disrupted DOF1 (Dof1) gene	5e ⁻¹⁶⁰
ET053000 População sem espinho	Similar com <u>DQ156557.1</u> (<i>Zea mays</i>)	phosphinothricin acetyltransferase gene	1e ⁻²⁵

O gene DOF1 compreende um grupo de fatores de transcrição em plantas, com seqüência de aminoácidos bem conservada (Yanagisawa, 1996) contendo a seqüência AAAG que corresponde a um domínio *zinc finger*, que é essencial à ligação de proteínas regulatórias ao DNA. As proteínas DOF são responsáveis por processos de expressão da regulação de resposta à luminosidade, regulação de respostas ao estresse, resposta à fitohormônios e controle de atividades transcricionais tecido-específicas (Zhang *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996; Vicente-Carbajosa *et al.*, 1997; Kisu *et al.*, 1998; Mena *et al.*, 1998; Yanagisawa; Sheen, 1998; Baumann *et al.*, 1999; Kang; Singh, 2000; Yanagisawa, 2000; Cavalari *et al.*, 2007). No milho, a proteína DOF1 ativa promotores responsáveis pela expressão de genes relacionados ao sinal de luminosidade, incluindo plantas C4 com gene fotossintético codificador da fosfoenolpiruvato carboxilase (Izui, 1993; Yanagisawa, 1996; Yanagisawa, 2000). A super-expressão de DOF1 em *Arabidopsis thaliana* induz genes envolvidos no metabolismo do carbono e aumenta a fixação de nitrogênio sob condições limitantes (Yanagisawa *et al.*, 2004).

O gene codificador de fosfinotricina acetiltransferase, com o qual a sequência do pequi sem espinho mostrou similaridade, é uma transferase que catalisa a acetilação da fosfinotricina, um análogo do glutamato, herbicida que exerce efeito fitotóxico nas plantas, por inibição da glutamina sintetase (Hoagland, 1999; Gill *et al.*, 2001; Hérout *et al.*, 2005).

O fato do gene codificador de DOF1 ocorrer nas populações com espinho e o da fosfinotricina acetiltransferase estar se expressando no pequi sem espinho, permanece sem explicações. Não se sabe o efeito que os produtos desses genes exercem no pequi. Os marcadores genômicos desenvolvidos nesse trabalho poderão contribuir para a identificação de genes relacionados à ausência de espinho no endocarpo, na restrita população de São José do Xingu - MT. É possível buscar a via metabólica dos peptídeos codificados por esses genes e sua função no bloqueio do aparecimento de espinho no caroço do pequi.

As análises por BLAST das proteínas presentes em *C. brasiliense* sem e com espinho (Tabela 3) mostraram similaridades dos clones ET 053002 e ET 053006 de pequi sem espinho com a proteína CPFTSY (Deficiência em Redutase Férrica 4) de *Z. mays* e os clones ET 053011 e ET 053012 do pequi com espinho com a proteína catalase de *Arabidopsis thaliana*. As plantas deficientes em ferro induzem a ligação da redutase férrica à membrana plasmática, com transferência de elétrons do NADH ou NADPH intracelular para Fe^{3+} na rizosfera (Sijmons *et al.*, 1984; Buckhout, *et al.*, 1989). Os íons Fe^{2+} são, subsequentemente, liberados e conduzidos ao citoplasma, via proteínas de transporte, induzindo a acidificação das raízes, estimulada pela deficiência em ferro (Kochian, 1991; Fox *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 1997) o que, por sua vez, contribui para o aumento da solubilidade de ferro disponível à planta (Marschner *et al.*, 1986). Plantas que crescem em solos pobres em ferro são selecionadas e mostram aumento de disponibilidade de ferro na rizosfera (Marschner *et al.*, 1986; Inskip; Bloom, 1987). As respostas adaptativas das raízes diferem de acordo com a espécie. Em dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramíneas verifica-se a diferenciação morfológica e fisiológica das raízes (Romheld, 1987; Marschner; Romheld, 1994; Schmidt, 1999; Orturk *et al.*, 2007). O aumento na capacidade das

raízes em reduzir quelatos de ferro, pela indução da redutase férrica na membrana plasmática é outra resposta à deficiência de ferro. A redução de Fe³⁺ em Fe²⁺ na superfície das raízes é um processo obrigatório à aquisição de ferro pelas plantas (Marchner; Romheld , 1994; Robinson *et al.*, 1999).

Tabela 3: Análise de Bioinformática (BLASTx) dos clones selecionados por RAPD em *Caryocar brasiliense* (Cambess.) com e sem espinho no caroço.

Clone (número de acesso no GenBank)	Similaridade	Nome	e-value
ET053002 População com espinho	Similar com <u>NM 130140.2</u> (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	CPFTSY (ferric reductase deficient 4)	2e ⁻²²
ET053011 População sem espinho	Similar com <u>pir A55092</u> (<i>Zea mays</i>)	catalase (EC 1.11.1.6) CAT-2 -maize fragment)	1e ⁻⁰⁹
ET053006 População com espinho	Similar com <u>NM 130140.2</u> (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	CPFTSY (ferric reductase deficient 4)	3e ⁻¹¹
ET053012 População sem espinho	Similar com <u>pir A55092</u> (<i>Zea mays</i>)	catalase (EC 1.11.1.6) CAT-2 -maize fragment)	2e ⁻⁰⁶

A catalase é uma das enzimas antioxidantes que degradam a água oxigenada (Scandalios et al., 1997). O processo de foto-oxidação durante estresse abiótico é comum em plantas, podendo causar destruição celular, liberando espécies reativas do oxigênio como a água oxigenada. (Foyer, 1996). A super-redução do fotossistema II (PSII) ocorre quando a assimilação do carbono é reprimida durante o estresse ambiental e quando o fluxo de luminosidade é elevado. Nesses estados de excesso de fótons, o PSII se torna progressivamente reduzido e provoca na planta, o estresse oxidativo que produz oxigênio livre e, possivelmente, superóxido (Krause, 1994; Osmond; Grace, 1995). Nesse

contexto, a catalase atua nas plantas como enzima antioxidante, interferindo nos processos de envelhecimento e senescência.

Apesar de, em vegetais, ocorrer elevada presença de proteínas antioxidantes devido as pressões de seleção as quais estão submetidas, o papel da proteína responsável pela deficiência da redutase férrica e da catalase não é conhecido em *Caryocar brasiliense*. Sugere-se que a deficiência de ferro nas raízes provoca, na população sem espinho, um estresse ambiental, que leva à supressão da produção de espinhos no caroço, enquanto que nas populações com espinho, a presença da catalase impede o estresse oxidativo e a consequente produção dos espinhos no caroço.

Conclusão

A análise por marcadores RAPD revelou divergência genética entre as populações de pequi com e sem espinho no caroço. A ausência de espinho no caroço do pequi pode ser explicada, pelos dados obtidos até o momento, pelo estresse oxidativo que a planta sofre devido à deficiência em Redutase Férrica, enquanto que a presença de espinhos pode estar relacionada à presença do antioxidante catalase que impede o estresse oxidativo nas populações.

Referências Bibliográficas

ALENCAR, G. Pequizeiros enfrentam riscos de extinção. **Hoje em dia**, 13 fev., p.7, 2000.

ALMEIDA, S.P.; SILVA, J.A. Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos cerrados. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1994. 38P. (Documentos, 54).

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

ARAUJO, F.D. de. **The ecology, ethnobotany and management of *Caryocar brasiliense* Camb. Around Montes Claros, MG, Brazil.** 1994. 175p. Thesis (Doctor in Plant Sciences) – University of Oxford, Oxford.

ARAUJO, F.D. de. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) na economically valuable of central Brazilian Cerrados. **Economic Botany**, v.49, p.40-48, 1995.

ALTSCHUL S.F.; GISH, W.; MYERS E.W.; LIPMAN. D.J. **J. Molec. Biol.** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* V. 215; p. 403-410, 1990.

BARRADAS, M.M. Informações sobre a floração, frutificação e dispersão do piqui (*Caryocar brasiliense* Camb.) (Caryocaraceae). **Ciência e Cultura**, v. 24, p. 1063-1068, 1972.

BAUMANN, K.; DE PAOLIS, A.; COSTANTINO, P.; GUALBERTI, G. The Dna binding site of the Dof protein NtBBF1 is essential for tissue-specific and auxin-regulated expression of the rolB oncogene in plants. **Plant Cell**, v. 11, p. 323-333, 1999.

BRANDÃO, M.; LACA-BUENDÍA, J.P.; MACEDO, J.F. **Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002, 528p.

BUCKHOUT, T.J.; BELL, P.F.; LUSTER, D.G.; CHANEY, R.L. Iron-stress induced redox activity in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) is localized on the plasma membrane. **Plant Physiol**, v. 90, p. 151-156, 1989.

CAVALAR, M.; PHILIPPEN, Y.; KREUZALER, F.; PETERHANSEL, C. A drastic reduction in Dof 1 transcript levels does not affect C₄-specific gene expression in maize. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1665-1674, 2007.

CHEN, W.; CHÃO, G.; SINGH, K.B. The promoter of a H₂O₂-inducible, *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1 binding sites. **Plant J**, v.11, p. 955-966, 1996.

CHEVEZ - POZO, O.V. **O pequi (*Caryocar brasiliense*): uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do cerrado no norte de Minas Gerais**.1997. 100f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

COHEN, C.K.; NORVELL, W.A.; KOCHIAN, L.V. Induction of the root cell plasma membrane ferric reductase. **Plant Physiol**, v. 114, p. 1061-1069, 1997.

CORNER, E.J.H. **The seeds of dicotyledons**. Cambridge: Cambridge university, 1979. v.1, 311p.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Editora UFV, 2003. 579p.

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

FOX, T.C.; SHAFF, J.E.; GRUSAK, M.A.; NORVELL, W.A.; CHEN, Y.; CHANEY, R.L.; KOCHIAN, L.V. Direct measurement of ^{59}Fe -labeled Fe^{2+} influx in roots of pea using a chelator buffer system to control free Fe^{2+} in solution. **Plant Physiol**, v.111, p. 93-100, 1996.

FOYER, C.H. Oxygen processing in photosynthesis. **Biochem. Soc. Trans**, v. 24, p. 427-433, 1996.

GILL, H.S.; PFLUEGL, G.M.U.; EISENBERG, D. The crystal structure of phosphinothricin in the active site of glutamine synthetase illuminates the mechanism of enzymatic action. **Biochemistry**, v. 40, p. 1903-1912, 2001.

GRIBEL, R. **Ecologia da polinização e da dispersão de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) na região do Distrito Federal, Brasília**. 1986. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília.

HÉROUET, C.; ESDAILE, D.J.; MALLYON, B.A.; DEBRUYNE, E.; SCHULZ, A.; CURRIER, T.; HENDRICKX, K.; KLIS, R.; ROUAN, D. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. **Regulatory toxicology and Pharmacology**, v. 41, p. 134-149, 2005.

HOAGLAND, R.E. Biochemical interactions of the microbial phytotoxin phosphinothricin and analogs with plants and microbes. In: Cutler, H.G.; Cutler, S.J, editors. **Biologically active natural products: agrochemical**. Boca Raton, FL: CRC Press; 1999, p. 107.

INSKEEP, W.P.; BLOOM, P.R. Soil chemical factors associated with soybean chlorosis in calcareous soils of western Minnesota. **Agronomy Journal**, v. 79, p. 779-786, 1987.

KANG, H.G.; SINGH, K.B. Characterization of salicylic acid-responsive, *Arabidopsis* DOF domain proteins: over-expression of OBP3 leads to growth defects. **Plant J.**, v.21, p. 329-339, 2000.

KERR, W.E.; SILVA, F.R.da.; TCHUCARRAMAE, B. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). Informações preliminares sobre um pequi sem espinhos no caroço. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 29, p.169-171, 2007.

KISU, Y.; ONO, T.; SHIMOFURUTANI, N.; SUZUKI, M.; ESAKA, M. Characterization and expression of a new class of zinc finger protein that binds to silencer region of ascorbate oxidase gene. **Plant Cell Physiol**, v. 39, p. 1054-1064, 1998.

KOCHIAN, L.V. Mechanisms of micronutrient uptake and translocation in plantas. In: MORTVEDT, J.J.; COX, F.R.; SHUMAN, L.M.; WELCH, R.M. eds, **Micronutrients in Agriculture**, ed 2. Soil Science Society of América, Madison, WI, p.229-296, 1991.

KRAUSE, G.H. The role of oxygen in photoinhibition of photosynthesis. In FOYER, C.H.; MULLINEAUX, P.M. (eds.), Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 43-79, 1994.

LONDE, L.N. **Indução de respostas morfogênicas em *Anacardium humile* St. Hill (Anacardiaceae) e análise da divergência genética entre populações.** 2005. 140p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

LOPES, P.S.N.; SOUZA, J.C. de; REIS, P.R.; OLIVEIRA, J.M.; ROCHA, I.D.F. Caracterização do ataque da broca dos frutos do pequi. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 25, p. 540-543, 2003.

MARSCHNER, H.; ROMHELD, V. Strategies of plantas for acquisition of iron. **Plant and Soil**, v. 165, p. 261-274, 1994.

MARSCHNER, H.; ROMHELD, V.; KISSEL, M. Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. **Journal of Plant Nutrition**, v. 6, p. 695-713, 1986.

MENA, M.; VICENT-CARBAJOSA, J.; SCHMIDT, R.J.; CARBONERO, P. An endosperm-specific DOF protein from barley, highly conserved in wheat, binds to and activates transcription from the prolamin-box of a native β -hordein promoter in barley endosperm. **Plant J**, v. 16, p. 53-62, 1998.

MESSMER, M.M.; MELCHINGER, A.R.; HERMANN, R.R.; BOPPERNMAIER, J. Relationships among early European maize inbreds: I. Comparison of pedigree and AFLP data. **Crop Science**, v.33, p. 944-950, 1993.

ORTURK, L.; YAZICI, A.; EKER, S.; GOKMEN, O.; ROMHELD, V.; CAKMAK, I. Glyphosate inhibition of ferric reductase activity in iron deficient sunflower roots. **New Phytologist**, v. 177, p. 899-906, 2007.

PATERSON, B.D.; MACRAE, E.A.; FERGUSON, I.B. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV). **Anal Biochem**, v. 139, p. 487-492, 1984.

OSMOND, C.B.; GRACE, S.C. Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? **J.Exp. Bot.**, v. 46, p. 1351-1362, 1995.

RIBEIRO, A.E. O espaço, o homem e o seu destino no norte de Minas. In: Universidade Federal de Lavras. Departamento de Administração e Economia.

Manejo sustentado do cerrado para uso múltiplo: subprojeto agroecologia e desenvolvimento. Lavras, 1996. p. 89-152.

ROBINSON, N.J.; PROCTER, C.M.; CONNOLLY, E.L.; GUERINOT, M.L. A ferric-chelate reductase for iron uptake from sils. **Nature**, v. 397, p. 694-697, 1999.

SANTOS, B.R.; PAIVA, R.; DOMBROSKI, J.L.D.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R.C.; SILVA, A.A.N. **Pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.)**: uma espécie promissora do cerrado brasileiro. http://www.editora.ufla.br/Boletim/pdf/bol_64.pdf. Accessed on: 3 Sept. 2007.

SCANDALIOS, J.G.; GUAN, L.M.; POLIDOROS, A. Oxidative Stress and the molecular biology of antioxidante defenses, ed. Scandalios, J.G. (Cold spring Harbor Lab. Press, Plainveiew, NY) pp. 343-406, 1997.

SCHIMIDT, W. Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. **New Physiology**, v.141, p. 1-26, 1999.

SIJMONS, P.C.; VAN DER BRIEL, W.; BIENFAIT, H.F. Cytosolic NADPH is the electron donor for extracellular Fe(III) reduction in iron-deficient bean roots. *Plant Physiol*, v. 75, p. 219-221, 1984.

SOUSA, C.S. **Avaliação da germinação, resistência à septoriose e introdução ao estudo molecular da alface (*Lactuca sativa* L). cv. Uberlândia**. 2002. 90p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Ubelândia.

VICENT-CARBAJOSA, J.; MOOSE, S.P.; PARSONS, E.; SCHMIDT, R.J. A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interacts with the basics leucine zipper transcriptiona activator Opaque2. **Proc. Natl Acad. Sci.USA**, v.94, p. 7685-7690, 1997.

YANAGISAWA, S. DOF DNA binding proteins contain a novel zinc finger motif. **Trends Plant Sci.** v.1, p. 213-214. 1996.

YANAGISAWA, S. Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. **Plant J.**, v. 21, p. 281-288, 2000.

YANAGISAWA, S.; AKIYAMA, A.; KISAKA, H.; UCHIMIYA, H.; MIWA, T. Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: Improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.10, p. 10, 2004.

YANAGISAWA, S.; IZUI, K. Multiple interactions between tissue-specific nuclear proteins and the promoter of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene for C₄ photosynthesis in *Zea mays*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 224, p. 325-332, 1993.

YANAGISAWA, S.; SHEEN, J. Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. **Plant Cell**, v. 17, p. 209-214, 1998.

YANG, T.; POOVAIAH, W. Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. **PNAS**, v. 99, p. 4097-4102, 2002.

ZHANG, B.; CHEN, W.; FOLEY, R.C.; BUTTNER, M.; SINGH, K.B. interactions between distinct types of DNA binding protein enhance binding to ocs element promoter sequences. **Plant Cell**, v.7, p. 2241-2252, 1995.

CAPÍTULO III

Citogenética de *Caryocar brasiliense* (Cambess). **pequizeiro com e sem espinho no caroço**

Resumo

Citogenética de *Caryocar brasiliense* (Cambess.) pequizeiro com e sem espinho no caroço

O pequi, *Caryocar brasiliense* Cambess., é uma planta característica do cerrado brasileiro que sofre ação extrativista, principalmente, para a alimentação. É uma planta bastante apreciada em regiões de Minas Gerais, especialmente no Norte desse estado. Na região de São José do Xingu, Mato Grosso, foi encontrada uma planta produzindo pequi sem espinhos no caroço. O estudo citogenético, por meio de coloração convencional de Giemsa, NOR, banda C, DAPI e CMA₃ foi utilizado para a comparação entre plantas produtoras de pequi com e sem espinhos no caroço. Verificou-se que essas diferenças não podem ser atribuídas à diferenças cromossômicas entre os dois tipos de pequi. Ambas as plantas têm o mesmo número cromossômico, mesma marcação de NOR. Não foi verificado bandeamento C devido ao tamanho dos cromossomos. Diferenças de coloração com DAPI e CMA₃ foram detectadas, porém não é possível afirmar que estejam relacionadas com a presença ou ausência de espinhos no fruto.

Palavras-chave: *Caryocar brasiliense*, Giemsa, banda C, NOR, DAPI, CMA₃

Abstract

Cytogenetic of *Caryocar brasiliense* (Cambess.) with an without thorn in the endocarp

The pequi, *Caryocar brasiliense* Cambess. Is a feature of Brazilian cerrado plant suffering extractive action, mainly for food. It is a plant very appreciated in the regions of Minas Gerais, especially in the north of this state. In the region of Sao Jose do Xingu, Mato Grosso, was found in a plant which had no thorns in the core and this allowed further research to discover the lack of thorns as it is an unwanted feature of the plant. Thus, the cytogenetic study, using conventional Giemsa staining, NOR, banda C, DAPI and CMA₃ were used for comparison between the pequi with and without spines in the putamen. It was found that these differences are not attributed to chromosomal differences between the two types of pequi. Both have the same chromosome number, the marking of NOR, C banding was not verified due to the size of chromosomes and differences in staining with DAPI and CMA₃ could not be verified although related to these characteristics.

Key words: *Caryocar brasiliense*, Giemsa, banda C, NOR, DAPI, CMA₃

Introdução

Caryocar brasiliense Cambess. (Caryocaraceae), pequi, é uma das espécies que têm se destacado no bioma do Cerrado. É uma frutífera de grande importância na região Norte de Minas, onde o extrativismo dos frutos é de relevância para a alimentação do sertanejo, além de constituir-se em fonte de renda (Chevez Pozo, 1997; Araújo, 1995).

Essa espécie tem se destacado, pelo uso dos frutos na alimentação humana, por meio do preparo de pratos típicos, condimentos, óleos e bebidas adocicadas (Barradas, 1972; Corner, 1976, Almeida, Silva, 1994; Araújo, 1994; Lopes *et al.*, 2003, Santos *et al.*, 2006). É considerada fonte de vitaminas A e C, tiamina, proteínas e sais minerais, apresentando elevados teores de carotenóides; utilizada, ainda, na extração de óleos para a fabricação de cosméticos (Almeida *et al.*, 1998). Na medicina popular, é utilizado para tratamento de problemas respiratórios e oftalmológicos, contra bronquites, gripes, resfriados e no controle de tumores (Almeida, Silva, 1994). É considerado afrodisíaco e suas folhas são adstringentes e estimulam a produção de bÍlis (Almeida, Silva, 1994; Ribeiro, 1996; Brandão *et al.*, 2002, Kerr *et al.*, 2007). A casca além de ser utilizada em curtume, é tintorial (Brandão *et al.*, 2002). Sua madeira é de ótima qualidade e resistência (Almeida, Silva; 1994) e fonte de carvão para siderurgia (Ribeiro, 1996).

A região de ocorrência do pequi abrange, aproximadamente, 2000 municípios e estima-se em cerca de 40000 coletores para vender os frutos ou os caroços (putâmens ou endocarpo) aos compradores ou atravessadores. As pequenas farmácias e curandeiros das vilas e cidades dessas regiões são procurados por aproximadamente 3000 pessoas, no período de colheita, para retirarem os espinhos deixados pelos caroços no “céu da boca” de comedores descuidados. Essa característica é o principal defeito que elimina o pequi de ser cultivado em casa e de ser considerado uma fruta de mercado (Gribel, 1986; Kerr, 2007).

Na cidade de São José do Xingu (MT), Kerr *et al.* (2007) encontraram uma planta com frutos sem espinhos no putâmen (caroço), e segundo os autores os

“caroços” são carnudos e pouco mais doces do que os que contêm espinhos (Figuras 1 A, 1 B e 1C).

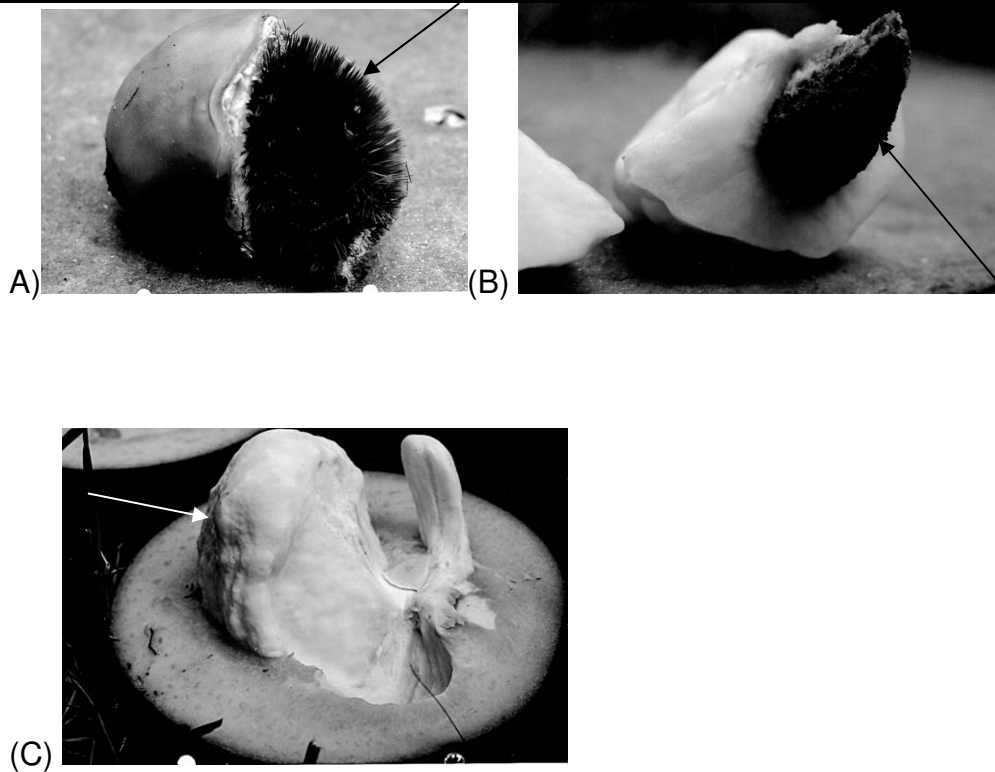


Figura 1: *Caryocar brasiliense* Cambess. Fonte: Kerr *et al.* (2007)

(A) Pequi com espinho no caroço. Fruto seccionado mostrando o caroço com pequenos espinhos (seta).

(B) Pequi sem espinho no caroço. Fruto seccionado mostrando o caroço sem os espinhos (seta).

(C) Pequi sem espinho no caroço. Fruto seccionado mostrando o caroço (seta branca).

Essas características nos induziram ao estudo do pequi sem espinho para, dentro de 4 a 8 anos, fazer distribuição de mudas desse pequi. Essa mutação apresenta todas as características para transformar o pequi em fruta de mercado,

tanto para as populações locais quanto para os mercados regulares de frutas nacionais e estrangeiras.

A citogenética da família Caryocaraceae já foi explorada por Ehrendorfer *et al.* (1984) que mostraram que *Caryocar microcarpum* e *C. villosum* possuem conjunto diplóide de 46 cromossomos, impossível de distinguir os minúsculos cromossomos de possíveis satélites, devido à morfologia e estrutura cromossômica nessa espécie.

O objetivo desse trabalho foi identificar citogeneticamente as plantas que produzem pequi com e sem espinho no caroço utilizando análise convencional de Giemsa, região organizadora de nucléolo (NOR), bandamento C e fluorocromos: cromomicina (CMA₃) e DAPI.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Ápices caulinares de cinco exemplares de plantas que produzem pequi com espinho e três exemplares das que produzem pequi sem espinho, todos reproduzidos por enxertia, foram coletados para as análises citogenéticas. Os exemplares de pequizeiro foram coletados na Fazenda Água Limpa, da Universidade Federal de Uberlândia, na cidade de Uberlândia, Minas Gerais.

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Genética, Citogenética Animal e Citogenética Vegetal do Instituto de Genética e Bioquímica e do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia (MG – Brasil) onde, também, foram realizadas as análises experimentais.

Preparação para análise convencional dos cromossomos

Para a obtenção de lâminas, os ápices caulinares foram pré-tratados com 8-hidroxiquinoleína 2 mM por uma hora a temperatura ambiente, seguido de 23 horas em geladeira a 10°C. As amostras foram fixadas em etanol: ácido acético (3:1) (*Carnoy*) à temperatura de 20°C, solução que foi trocada a cada 24 horas por 3 dias antes do armazenamento em freezer. Em seguida, os meristemas foram retirados sob estereomicroscópio (QUIMIS) e submetidos à digestão em solução enzimática contendo celulase 4% e pectinase 40% por uma hora a 37 °C. Os meristemas foram, então, hipotonizados em água destilada por 5 minutos e hidrolizados em solução de HCl 5N à temperatura ambiente por 20 minutos. Após hidrólise, os meristemas foram submetidos à lavagem em água destilada, dissecados em uma gota de ácido acético 45% e dissociados (Carvalho, Saraiva; 1997).

Em estereomicroscópio, o meristema foi cortado, espalhado em lâmina e coberto por lamínula, que foi retirada em nitrogênio líquido, após congelamento.

As lâminas foram submetidas à coloração com Giemsa 2% e as lâminas permanentes montadas com Entellan (Merck).

Bandeamento cromossômico

Região organizadora de nucléolo (RON)

Para a verificação de regiões organizadoras de nucléolo, as lâminas preparadas por digestão enzimática com celulase 4% e pectinase 40%, foram coradas com solução de nitrato de prata 50% e colocadas em estufa a 60°C por 50 minutos (Howell; Black, 1980).

Coloração com fluorocromos CMA₃ e DAPI

As lâminas foram preparadas com digestão enzimática com celulase 4% e pectinase 40% e envelhecidas por 3 dias à temperatura ambiente (Guerra, 2002).

Para coloração com cromomicina (CMA₃) uma gota de CMA (0,5 mg/ml) foi colocada sobre as células, na lâmina, coberta com lamínula e mantida em estufa por 1 hora a 37°C. A lamínula e o excesso de corante foram retirados com jato de água destilada e as lâminas secas à temperatura ambiente.

Para coloração com DAPI às lâminas foi adicionada uma gota de DAPI (2 µg/ml), cobertas com lamínula e mantidas em estufa por 30 minutos à 37°C. A lamínula e o excesso de corante foram retirados com jato de água destilada e as lâminas secas à temperatura ambiente. Após coloração as lâminas foram mantidas em caixa escura à temperatura de 20°C, até análise.

Bandeamento C – heterocromatina constitutiva

As lâminas foram preparadas por digestão enzimática com celulase 4% e pectinase 40%, envelhecidas por 3 dias à temperatura ambiente e submetidas à hidrólise, por 10 minutos, com ácido acético 45% em banho-maria pré-aquecido a 60°C.

Após hidrólise as lâminas foram lavadas por 1 minuto em água corrente de torneira e secas ao ar.

As lâminas sofreram desnaturação em solução saturada de hidróxido de bário à temperatura de 60°C, durante 5 minutos; lavadas em água, colocadas, novamente, em solução de ácido acético 45% por 2 minutos, lavadas em água destilada e secas.

Para a renaturação, as lâminas foram transferidas para um jarro Coplin com 2XSSC pré-aquecido a 60°C em banho-maria durante 80 minutos; lavadas em água destilada, secas com bomba de ar e coradas com Giemsa 2%, por 20 minutos. O excesso de corante e a lamínula foram retirados com jato de água corrente (Guerra, 2002).

Análises ao microscópio

As observações da coloração convencional foram feitas com uso de microscópio Olympus BX 60, sob iluminação de campo claro, sob aumento de 100X. As imagens foram capturadas diretamente, por meio de microcâmera acoplada ao microscópio e a um microcomputador Macintosh TM (modelo G3) equipado com placa digitalizadora.

As análises dos fluorocromos CMA/DAPI foram realizadas em microscópio Leitz com o uso de filtro de 340 a 380 nm para a coloração DAPI e 390 a 490 nm para a coloração CMA.

Resultados e Discussão

Os cromossomos de *C.brasiliense* são muito pequenos e de difícil diferenciação do núcleo cromocêntrico, dificultando a identificação da metáfase (Figura 2).

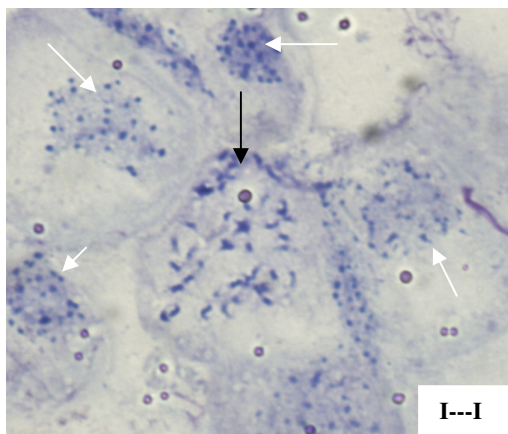


Figura 2: Núcleos cromocêntricos (setas brancas) de metáfase (seta preta) de cromossomos de pequi (*Caryocar brasiliense*). Barra corresponde a 5 μ m.

Diferenças nos núcleos interfásicos correspondem a variações no padrão de condensação dos cromossomos (Pôrto, 2007).

Os núcleos reticulados são característicos das monocotiledôneas, briófitas e algas clorófilas, onde se observam numerosas bandas de cromatina densa entremeadas com regiões de cromatina frouxa, fibrilas e grânulos. Os núcleos cromocêntricos são mais freqüentes em dicotiledôneas, apresentando grupos periféricos de cromatina densa (Echeverría et al., 1999). Numerosos núcleos cromocêntricos foram identificados na intérfase em pequi. Esses núcleos cromocêntricos são caracterizados pela presença de muitas partículas agregadas

de blocos heteropicnóticos e linhas irregulares que, gradualmente, são transformadas em cromatina difusa (Felix & Guerra, 2000).

A análise cariotípica das populações de *C. brasiliense* produtor de frutos com e sem espinho no caroço revelou número cromossômico constante, com $2n = 46$ cromossomos (Figura 3), assim como encontrado por Ehrendorfer *et al.* (1984) em *C. microcarpum* e *C. villosum*, utilizando coloração convencional por Giemsa.

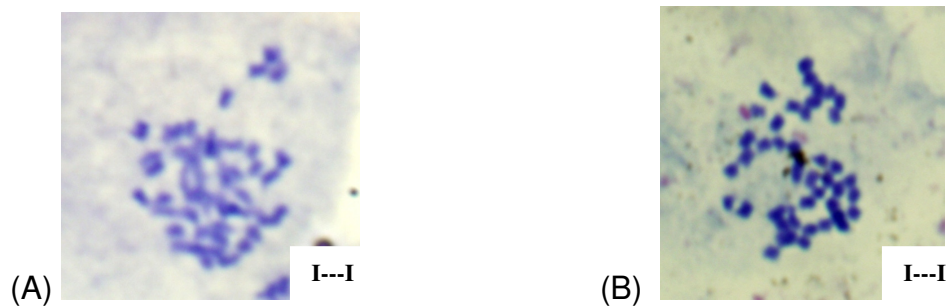


Figura 3: Conjunto cromossômico do pequizeiro com frutos com espinho (A) e sem espinho (B) revelando o conjunto diplóide de 46 cromossomos em ambas populações. Coloração por Giemsa. Barra corresponde a 5 μm .

Devido ao tamanho dos cromossomos é impossível distingui-los em acrocêntrico, metacêntrico ou submetacêntrico.

Cromossomos em diferentes estádios de compactação podem provocar erros na classificação cariotípica. Os cromossomos mais compactados não permitem que as constrições secundárias sejam facilmente localizadas, ao mesmo

tempo que os menos compactados apresentam diversas constrições, o que pode dificultar a identificação das regiões centroméricas.

Cromossomos prometafásicos, especialmente de plantas com cromossomos pequenos e que se condensam intensamente no estágio metafásico, podem proporcionar informações importantes, que não poderiam ser vistas se os cromossomos não estivessem em grau maior de compactação (Clark; Wall, 1992; Fukui; Nakayama, 1996).

Cromossomos mais distendidos podem ser bandeados e a principal importância de sua utilização em estudos morfológicos tem sido a determinação extra das bandas e dos pontos de quebra-fusão, quando ocorrem alterações cromossômicas (Therma; Susman, 1992). Dessa forma, as técnicas de bandejamento cromossômico têm contribuído para a identificação de alterações cromossômicas e seus locais de ocorrência no genoma (Giannoni; Lui, 1988; Torres-Mariano; Morelli, 2008).

As análises de região organizadora de nucléolo (RON) mostraram que ambas as populações de frutos com e sem espinho no caroço, possuem RON simples, evidenciada por marca em apenas 1 par de cromossomos (Figura 4). Na população com espinho no caroço foi verificado um único nucléolo nos núcleos encontrados.

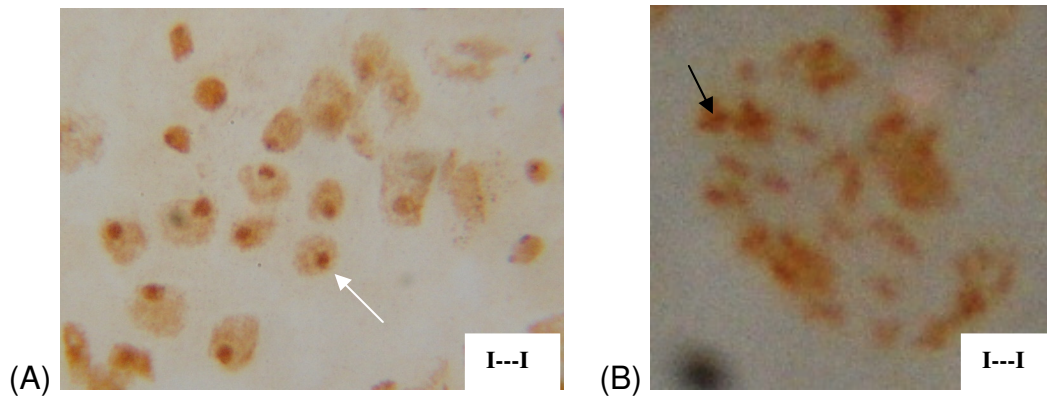


Figura 4: Células de *C. brasiliense* Camb. coradas com nitrato de prata para a visualização de RON, mostrando nucléolo simples no pequizeiro com espinho (A) (pontos escuros nas células – seta branca) e RON simples no sem espinho (B) (seta preta). Barra corresponde a 5 µm.

Segundo Cermeño et al. (1984), Copenhaver; Pikaard (1996) e Pedrosa et al. (1997) citam que nas regiões organizadoras nucleolares estão localizados os genes rRNA responsáveis pela formação do nucléolo que é um sítio de síntese ribossômica, durante a intérfase. Mc Clintock, em 1934, relatou que as NORs em cromossomos metafásicos apresentam, em geral, dois componentes: o sítio de formação nucleolar interfásico e a heterocromatina adjacente, denominada satélite (Von Kalm; Smyth, 1983).

As RONS são os locos genéticos mais estudados em citogenética, por causa de suas peculiaridades de função e estrutura. Apresentam variação no tamanho dentro de uma mesma espécie, por causa do seu alto índice de repetição (Lay, 1978; Guerra, 1988; Fukui; Nakayama, 1996; Pedrosa et al., 1997; Aarestrup, 2001). O tamanho relativo da banda de prata em cada cromossomo com RON tem refletido a sua atividade transcricional e, apesar dos conhecimentos que se tem a respeito da estrutura e da organização do rDNA, pouco se sabe

sobre a regulação e a manutenção da expressão dos diferentes genes presentes em várias RONS (Aarestrup, 2001).

Nos estudos citogenéticos de pequi, ainda não havia descrição quanto ao número, tamanho e localização de RON. Embora os cromossomos sejam muito pequenos, a RON pode ser detectada, porém não se identifica em qual cromossomo está presente e qual sua localização no braço cromossômico.

Análise comparativa do pequizeiro produtor de frutos com e sem espinho no caroço, por meio da técnica de bandeamento C, mostrou-se pouco informativa devido ao pequeno tamanho e similaridade dos cromossomos. Não houve distinção de regiões heterocromáticas, sendo observada homogeneidade na coloração dos cromossomos de pequi com e sem espinho no caroço.

Apesar da grande contribuição citogenética que o bandeamento C proporciona, muitas espécies apresentam as regiões heterocromáticas dispersas pelo genoma ou em quantidade tão reduzida que não ocorre formação de bandas, impedindo a diferenciação linear dos cromossomos por essa metodologia (Bertão, 1993). Verificamos isso nos cromossomos de pequi com e sem espinho no endocarpo.

Os fluorocromos DAPI e CMA₃ foram utilizados no bandeamento com a finalidade de se comparar a distribuição da heterocromatina nos cromossomos de *C. brasiliense* produtor de frutos com e sem espinho no caroço.

O DAPI (4'-6'-Diamino-2-Phenylindole) é um fluorocromo que se liga, preferencialmente, às regiões cromossômicas ricas em bases nitrogenadas adenina e timina (AT) (Galbraith *et al.*, 1995; Fukui; Nakayama, 1996), enquanto que a cromomicina (CMA₃) tem preferência pelas bases citosina e guanina (CG) (Hizume *et al.*, 1989).

O uso do DAPI no pequizeiro de frutos com espinho não mostrou marcação, e os obtidos com o uso de CMA₃, específico para detecção de bases CG, resultou em marcação positiva, sendo evidenciadas sete regiões (Figura 5).

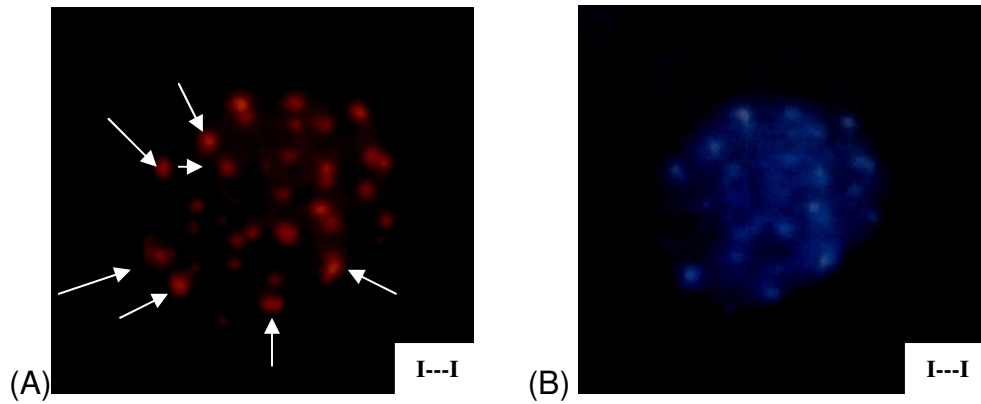


Figura 5: Bandeamento cromossômico com CMA₃ (A) e DAPI (B) no pequizeiro de frutos com espinho no caroço. As setas brancas mostram os cromossomos ricos em bases nitrogenadas CG. A coloração com DAPI não mostrou marcação em relação à CMA₃. Barra corresponde a 5 µm.

Quanto ao pequizeiro de frutos sem espinho no caroço, foram verificados oito cromossomos com marcação positiva de CMA₃ e o DAPI não apresentou marcação nos cromossomos (Figura 6).

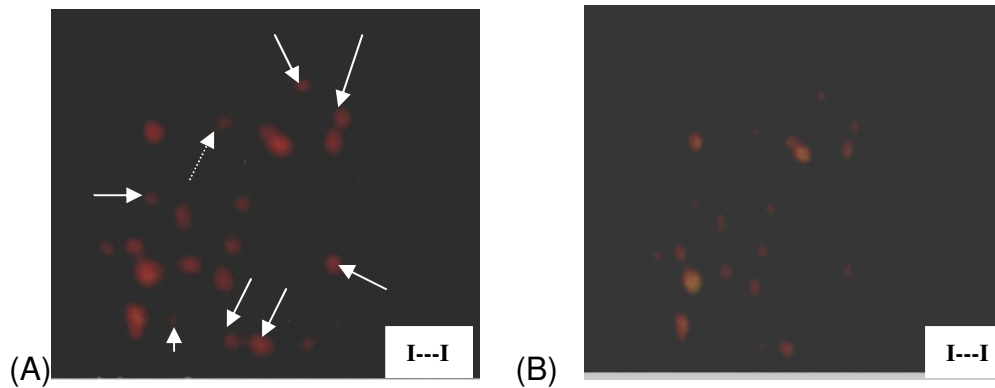


Figura 6: Bandeamento cromossômico com CMA₃ (A) e DAPI (B) no pequizeiro de frutos sem espinho no caroço. As setas brancas indicam os cromossomos marcados com CMA₃. Não ocorreu marcação com DAPI. Barra corresponde a 5 µm.

O pequeno número de cromossomos marcados com os bandeamentos CMA₃ indica que a quantidade de heterocromatina existente no pequizeiro de frutos com espinho e sem espinho no caroço é, relativamente baixa em todo genoma.

Ambas as plantas analisadas, com e sem espinho no caroço dos frutos, possuem iguais marcações sejam elas com Giemsa, RON, Bandeamento C, CMA₃ e DAPI. Esses resultados indicam que a ausência de espinhos não está relacionada à diferenças citogenéticas nas populações analisadas.

Conclusões

A análise cariotípica revelou que *Caryocar brasiliense* Cambess. (pequi) possui 46 cromossomos em seu número diplóide.

As análises citogenéticas do pequi produtor de frutos com e sem espinho mostraram que a ausência de espinhos no caroço não está relacionada a diferenças numéricas ou de bandeamento cromossômico nas populações estudadas.

Referências Bibliográficas

AARESTRUP, J.R. **Análise morfológica dos cromossomos de pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 2001. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.

AGREDANO-MORENO, L.T.; JIMÉNEZ-GARCIA, L.F. 2000. New evidence that Lacandonia granules are ultrastructurally related to perichomatin and Balbiani ring granules. **Biology of the Cell**, 92, 71-78.

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

ALMEIDA, S.P.; SILVA, J.A. Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos cerrados. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1994. 38P. (Documentos, 54).

ARAUJO, F.D. de. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) na economically valuable of central Brazilian Cerrados. **Economic Botany**, v.49, p.40-48, 1995.

ARAUJO, F.D. de. **The ecology, ethnobotany and management of *Caryocar brasiliense* Camb. Around Montes Claros, MG, Brazil**. 1994. 175p. Thesis (Doctor in Plant Sciences) – University of Oxford, Oxford.

BARRADAS, M.M. Informações sobre a floração, frutificação e dispersão do piqui (*Caryocar brasiliense* Camb.) (Caryocaraceae). **Ciência e Cultura**, v. 24, p. 1063-1068, 1972.

BERTÃO, M.R. **Evolução cariotípica no gênero *Capsicum* (Solanaceae)**. Piracicaba, S.P: ESALQ, 1993. 148p. (Dissertação – Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

BRANDÃO, M.; LACA-BUENDÍA, J.P.; MACEDO, J.F. **Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002, 528p.

CARVALHO, C.R.; SARAIVA, L.S. (1997) High-resolution HKG-banding in maize mitotic chromosomes. **J. Plant Res** 110:417-420.

CERMEÑO, M.C.; ORELLANA, J.; SANTOS, J.L.; LACADENA, J.R. Nucleolar organizer activity in wheat, rye and derivatives analyzed by a silver-staining procedure. **Chromosoma**, v.89, p. 370-376, 1984.

CHEVEZ - POZO, O.V. **O pequi (*Caryocar brasiliense*): uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do cerrado no norte de Minas Gerais**.1997. 100f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CLARCK, M.S.; WALL, W.J. **Chromosomes: the complex code**. Chapman e Hall, England, 1992. 345p.

COPENHAVER, G.P.; PIKAARD, C.S. RFLP and physical mapping with an rDNA-specific endonuclease reveal that nucleolus organizer regions of *Arabidopsis thaliana* the telomeres on chromosomes 2 and 4. **Plant Journal**, v.9, n.2, p.259-272, 1996.

CORNER, E.J.H. **The seeds of dicotyledons**. Cambridge: Cambridge university, 1979. v.1, 311p.

ECHEVERRÍA, O.; MORENO, D. E.S.; JIMÉNEZ-GARCIA, L.F.; VÁZQUEZ-NIN, G.H. 1999. Supramolecular Organization of a chromocentric plant nucleus. **Biology of the Cell**. v.91, p. 209-219.

EHRENDORFER , F. , MORAWETZ , W. AND DAWE , J. 1984. The neotropical angiosperm families Brunelliaceae and Caryocaraceae: first karyosystematical data and affinities. **Pl.Syst. Evol.**, 145, 183-191.

FÉLIX, L.P.; GUERRA, M. Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of Cymbidioide orchids. 2000. **Genetics and Molecular Biology**, 23, 4, 957-978.

FUKUI, K.; NAKAYAMA, S. Plant chromosomes: laboratory methods. CRC Press, U.S.A., 1996. 274p.

GALBRAITH, D.W.; BOURQUE, D.P.; BOHNERT, H.J. **Methods in plant cell biology part B**. Academy Press, U.S.A., 1995.

GIANNONI, M.L.; LUI, J.F. Citogenética e sua aplicação na seleção de reprodutores eqüinos. UNESP, Jaboticabal, 1988. 31p.

GRIBEL, R. **Ecologia da polinização e da dispersão de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) na região do Distrito Federal, Brasília**. 1986. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos**. Ribeirão Preto: Ed. Funpec, 2002, 131p.

GUERRA, M.S. **Introdução à Citogenética Geral**. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 1988. 142p.

HIZUME, M.; ISHIDA, F.; MURATA, M. Multiple locations of the rDNA genes in chromosomes of pines. *Pinus densiflora* and *P. trunbergii*. **Jpn. J. Genetics**, Mishima, 1988. 198p.

HOWELL, W.; BLACK, D. A., 1980, Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.

KERR, W.E.; SILVA, F.R.da.; TCHUCARRAMAE, B. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). Informações preliminares sobre um pequi sem espinhos no caroço. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 29, p.169-171, 2007.

LAY, Y.F.; PFEIFFER, R.A.; ARRIGHI, F.E.; HAS, T.C. Combination of silver and fluorescent staining for metaphase chromosomes. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 30, p. 76-79, 1978.

LOPES, P.S.N.; SOUZA, J.C. de; REIS, P.R.; OLIVEIRA, J.M.; ROCHA, I.D.F. Caracterização do ataque da broca dos frutos do pequizeiro. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 25, p. 540-543, 2003.

PEDROSA, A.; GUERRA, M.; FILHO, E.S.S. An hierarchy of activation of nucleolar organizer regions in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **Cytobios**, v. 92, p. 43-51, 1997.

PÔRTO, N.A. Citotaxonomia de espécies do gênero *Cróton* L. (Euphorbiaceae: Crotonideae) ocorrentes no nordeste do Brasil. 2007. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba.

RIBEIRO, A.E. O espaço, o homem e o seu destino no norte de Minas. In: Universidade Federal de lavras. Departamento de Administração e Economia. **Manejo sustentado do cerrado para uso múltiplo: subprojeto agroecologia e desenvolvimento.** Lavras, 1996. p. 89-152.

SANTOS, B.R.; PAIVA, R.; DOMBROSKI, J.L.D.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R.C.; SILVA, A.A.N. **Pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.):** uma espécie

promissora do cerrado brasileiro. http://www.editora.ufla.br/Boletim/pdf/bol_64.pdf.
Accessed on: 3 Sept. 2007.

SUMNER, A.T. **Chromosome banding**. Unwin Hyman, London, 1990. 434p.

THERMA, E.; SUSMAN, M. Human chromosomes. Structure, behavior and effects. Springer-Verlag, Germany. 1992. 376p.

TORRES-MARIANO, A. R. ; MORELLI, S . B chromosomes in *Astyanax eigenmanniorum* population (Characiformes, Characidae) from the Araguari River basin (Uberlandia, MG, Brazil). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 246-249, 2008.

VON KALM, L.; SMYTH, D.R. Ribosomal RNA genes and the substructure of nucleolar organizing regions in *Lilium*. **Can. J. Genet. Cytol.**, v.26, p. 159-166, 1983.

CAPÍTULO IV

IDENTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS EXPRESSAS NO FRUTO DO PEQUIZEIRO

(Caryocar brasiliense Cambess.)

Resumo

O pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess.) é uma espécie nativa do cerrado brasileiro e que possui importância alimentar e social para a população que dela depende. É uma espécie que sofre ação extrativista e que, atualmente, é considerada fonte para a produção de biodiesel. Nesse trabalho o objetivo foi identificar, a partir de uma biblioteca de cDNA, seqüências que estejam envolvidas em vias metabólicas para produção do fruto do pequi, para conhecimento da espécie, suas propriedades biológicas e genéticas. Dessa forma foi construída biblioteca de cDNA e os clones foram clonados e seqüenciados. As seqüências identificadas foram depositadas no GenBank. Algumas das seqüências encontradas estão relacionadas à proteção contra o estresse oxidativo em plantas, outras são fatores de transcrição e algumas seqüências expressas têm funções estruturais e de resistência a patógenos.

Palavras-chave: pequi, *Caryocar brasiliense*, EST's

Abstract

The pequi is a species that is gathered and today is seen as a source for the production of biodiesel. The objective of this study was to identify sequences from a cDNA library that are involved in the metabolic pathways for production of pequi fruit, to gain a better understanding of the species and its biological and genetic properties. To do so, a cDNA library was created and the clones were cloned and sequenced. These identified sequences were deposited in GenBank. Most of the sequences found are associated with protection against oxidative stress in plants, some are transcription factors and others provide structural and pathogenic resistance.

Key words: pequi, *Caryocar brasiliense*, EST's

Introdução

O pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Cambess.) é uma árvore de médio porte, natural do cerrado brasileiro e da região amazônica, chegando a 5 metros de altura quando adulta. É pouco exigente quanto às questões edáficas, crescendo, geralmente, em solos ácidos, pobres em cálcio, magnésio e matéria orgânica, profundos e porosos (Silva and Jesus 2007). Há relatos de boa adaptação a solos encharcados e, também, a solos secos e boa resistência a períodos de seca (MDA/SAF 2006).

A espécie apresenta valor econômico e social nas regiões do Cerrado, principalmente no Norte de Minas Gerais (Santos and Aoki 1992, Ribeiro et al. 1994, Silva et al. 1997, Ribeiro et al. 1997).

Do fruto pode ser aproveitada a polpa (mesocarpo) que possui grande quantidade de vitamina A (Carvalho and Burger 1960); além de vitaminas B₁ e B₂, gorduras, cálcio, fósforo, fibras, proteínas, ferro e gordura. Devido a sua composição, esse fruto poderia suprir a carência nutricional das populações que vivem nas áreas de cerrado.

O óleo é utilizado na medicina popular regional contra gripes e bronquites, sendo também utilizado para condimento (Almeida and Silva 1994, Ribeiro 2000), lubrificante (Peixoto 1973, Almeida and Silva 1994), na indústria de cosméticos (Heringer 1970, Peixoto 1973, Almeida and Silva 1994) e atualmente, está sendo explorado para a utilização na produção do biodiesel, após a esterificação do óleo da polpa para que se torne apto para a combustão. O pequi é uma fonte de óleo para biodiesel (3.200 kg/ha) com produtividade por hectare cerca de oito vezes superior à da soja (MDA/SAF 2006). A folha do pequi é considerada medicinal, já que estimula a secreção de bÍlis (Brandão et al. 1992) e o extrato etanólico das folhas tem atividade contra o sarcoma 180, um tipo de câncer de pele (Oliveira et al. 1970, Oliveira et al. 2005).

Recentemente, o pequi se tornou um fruto de mercado e a produção extrativista é escoada por meio de intermediários, vindos de outros municípios e estados. A estimativa é que a produção de pequi por extrativismo esteja em

declínio em função do desmatamento e como a demanda se mantém alta, a opção tem sido o plantio de mudas (MDA/SAF 2006).

Uma vantagem de produzir o pequi, para o agricultor familiar, é a possibilidade de se fazer consórcio com pasto, sendo possível passar de 1 para 2 cabeças de gado por hectare, sem degradação do ambiente. Além disso, a presença do gado representa um adicional de matéria orgânica no solo, o que favorece a plantação. Outras utilizações da espécie são reflorestamento e adensamento de áreas degradadas, visto que os custos de adubação e mão de obra para manutenção não são altos e não há necessidade de irrigação da área plantada (MDA/SAF 2006).

O estudo da genômica funcional ou transcriptoma do pequi permitirá a elucidação da função de genes envolvidos nos processos de diferenciação e desenvolvimento e/ou processos envolvidos nas respostas às alterações do ambiente biótico ou abiótico.

Transcritos específicos dentro de uma biblioteca de cDNA, geram um perfil quantitativo e qualitativo de diferentes tecidos, tipos de células e estágios de desenvolvimento, possibilitando estudos de expressão gênica e mapeamento genético (Boguski and Schuler 1995, Brendel et al. 2002, Ronning et al. 2003, Rudd 2003, Souza-Júnior et al. 2005).

O objetivo desse trabalho foi identificar, a partir de uma biblioteca de cDNA, seqüências que estejam envolvidas em vias metabólicas para produção do fruto do pequi, para conhecimento da espécie, suas propriedades biológicas e genéticas.

Material e Métodos

Área de coleta

Frutos de pequi com espinho foram coletados no cerrado da cidade de Uberlândia – MG e armazenados em nitrogênio líquido até o momento da manipulação em laboratório.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética, do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia – Minas Gerais – Brasil.

Extração de RNA

Para a extração de RNA do fruto utilizou-se o método do Trizol. Foram macerados 100mg do caroço do fruto em fase inicial de desenvolvimento, com nitrogênio líquido, em cadinho esterelizado com DEPC e autoclavado. Em seguida adicionou-se 1ml de Trizol ao tecido macerado e a solução foi transferida para tubos de 1,5 mL e vortexado por 5 minutos. Após agitação, adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio/mL de trizol. Essa solução foi, novamente, vortexada por 15 segundos e deixada a 30°C por 2 minutos, após o que foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para novo tubo de 1,5 mL, adicionando 0,5 mL de isopropanol/mL de trizol, misturada e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Descartou-se a fase líquida e o precipitado de RNA foi lavado com etanol 75% e centrifugado a 7.500 rpm por 5 minutos a 4°C. O precipitado foi seco ao ar por 15 minutos e ressuspendido em água tratada com 0,1% DEPC. O RNA foi mantido em ultrafreezer a -80°C.

A quantidade de RNA extraído foi estimada em espectrofotômetro, modelo GBC-UV/VIS911A (SONY), por leitura de absorbância a 260nm. A amostra quantificada e avaliada quanto à integridade, foi diluída em água milliQ para a concentração de 2 µg/µL, e mantida em ultrafreezer a -80°C.

Extração de RNA mensageiro

O RNAm foi extraído utilizando o *kit Micro-Fast Track™ 2.0 (Invitrogen)* seguindo as recomendações do fabricante.

Construção da biblioteca de cDNA

A biblioteca de cDNA foi construída utilizando o *kit Clone Miner™ cDNA Library Construction (Invitrogen)* seguindo as recomendações do fabricante.

Extração de plasmídeos

As colônias de bactérias *X blue* transformadas após a eletroporação e plaqueamento em meio LB (Luria Bertani) foram selecionadas e colocadas para crescer em placas para extração de plasmídeos.

A cada poço foram adicionados 240 µL de solução de GET, selada a placa com adesivo e vortexada por 2 minutos, ressuspensando as células. A placa foi centrifugada por 9 minutos a 3.700 rpm, o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se, novamente, 80 µL de solução de GET, selada a placa e vortexada até ressuspender as células.

Foram colocados 2 µL de RNase (10 mg/µL) em cada poço de uma nova placa e a suspensão de células foi transferida para ela. A essa suspensão foram adicionados 60µL de NaOH 0,2N/SDS1% recém preparado, selada a placa, invertida por 30 vezes e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. Adicionou-se a essa solução, 60 µL de KOAc 3M (anexo) gelado, selada novamente a placa, invertida por 30 vezes e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. O adesivo foi retirado após esse período e incubada a placa aberta a 90°C por 30 minutos, após o que foi selada e esfriada em gelo picado por 10 minutos e centrifugada por 9 minutos a 3.700 rpm a 20°C.

O sobrenadante (100 µL) foi transferido a uma placa de filtro Millipore e centrifugada por 6 minutos a 3.700 rpm a 20°C. Removeu-se a placa Millipore e adicionou-se ao filtrado 100 µL de isopropanol. A placa foi novamente selada com adesivo novo, invertida por 30 vezes e centrifugada por 45 minutos a 3.700 rpm a 20°C.

O adesivo foi retirado e descartado o sobrenadante. Ao precipitado foram adicionados 150 µL de etanol 70% gelado, centrifugado a placa por 10 minutos a 3.700 rpm a 20°C. O sobrenadante foi descartado e a placa invertida em papel absorvente por 15 minutos em temperatura ambiente.

O DNA plasmidial foi ressuspensionado em 10 µL de água milliQ, a placa foi coberta com novo adesivo e deixada à temperatura ambiente *overnight*, após o que foi mantida em *freezer* a -20°C.

Reação de sequenciamento em microtubos

Clones positivos foram seqüenciados em ambas direções em seqüenciador automático *MegaBaceTM* 1000 (Molecular Dynamics, Amersham Life Sciences), usando o método de sequenciamento dideoxi com *primers* universais M -13 Forward ou M -13 Reverse, seguindo as recomendações do fabricante.

Análise da identidade em bancos genéticos

As seqüências foram inicialmente submetidas ao Blastn (e value < 10⁻¹⁰) (Altschul et al. 1997) contra o banco de dados *GenBank* (Benson et al. 2002). Posteriormente, essas seqüências foram submetidas ao tBlastx (e value < 10⁻¹⁰) (Tatusov et al. 2003) para o alinhamento das seqüências obtidas do pequi com outras já depositadas no banco específico de plantas.

Resultados e Discussão

Foram obtidas 1.536 sequências a partir da biblioteca de cDNA do fruto de pequi, sendo que essas sequências apresentaram tamanho médio de 452 bases. Destas 1.536 sequências, 564 (36,71%) foram descartadas após a análise de qualidade. Dentre essas sequências descartadas, 324 (21,09%) foram em função do tamanho das sequências e 240 (15,62%) em função da qualidade das sequências.

As sequências restantes (972 ou 63,29%) apresentaram, após limpeza, número médio de bases com *Phred* acima de 20, por *read* bom, igual ou superior a 570 nucleotídeos.

A maior parte das sequências analisadas por Blastn quanto por tBlastx estão relacionadas à proteção contra o estresse oxidativo em plantas, outras são fatores de transcrição e de resistência a patógenos (GenBank números de acesso GR951205 a GR951217 e GT152673 a GT154478) (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1: Análise *in silico* (BLASTn) de sequências encontradas no transcriptoma de *Caryocar brasiliense*.

NSS	NS	<i>e-value</i>	Organismo
63	Cytochrome oxidase	$2.e^{-21}$	<i>Plantago lanceolata</i>
57	Disrupted DOF1	$2.e^{-102}$	<i>Zea mays</i>
183	Glycosyltransferase	$7.e^{-65}$	<i>Triticum aestivum</i>
45	Phosphinothricin acetyltransferase	$2.e^{-105}$	<i>Zea mays</i>
45	Superoxide dismutase 4A	$2.e^{-18}$	<i>Zea mays</i>

NSS = número de sequências similares encontradas na análise *in silico* de tBlastx

NS = nome da sequência que apresenta a similaridade

Tabela 2: Análise *in silico* (tBLASTx) de sequências encontradas no transcriptoma de *Caryocar brasiliense*.

NSS	NS	<i>e-value</i>	Organismo
283	Cytochrome oxidase	$4.e^{-21}$	<i>Globa sessiliflora</i>
83	Disrupted DOF1	$4.e^{-99}$	<i>Zea mays</i>
71	Glycosyltransferase	$2.e^{-176}$	<i>Triticum aestivum</i>
7	Histone acetyltransferase gene	$9.e^{-8}$	<i>Zea mays</i>
68	Phosphinothricin acetyltransferase	$1.e^{-94}$	<i>Zea mays</i>
3	Putative peroxidase	$8.e^{-7}$	<i>Zinnia elegans</i>
63	Superoxide dismutase 4A	$7.e^{-65}$	<i>Zea mays</i>

NSS = número de sequências similares encontradas na análise *in silico* de tBlastx

NS = nome da sequência que apresenta a similaridade

Quanto aos peptídeos relacionados ao estresse oxidativo de plantas são citadas a citocromo oxidase, a superóxido dismutase e as peroxidases. As plantas, no ambiente, estão expostas a estresses abióticos como salinidade, temperatura e toxicidade por metais pesados que afetam o crescimento e processos fisiológicos (Levitt 1980). O estresse abiótico atua como catalisador na produção de radicais livres resultando em estresse oxidativo em várias plantas, com produção de radicais superóxido (O_2), hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e alcóxil

(RO) (Scandalios 1993, Zhang and Kirkham 1994, Hernandez et al. 1994, Gallego et al. 1996, Weckx and Clijsters 1997, Loggini et al. 1999, Panda and Patra 2000, Bakardjieva et al. 2000, Hernandez et al. 2000). O radical superóxido tem meia vida menor que um segundo e é rapidamente dismutado pela superóxido dismutase em H_2O_2 , um produto que é relativamente estável e pode ser detoxificado pela catalase e peroxidases (Grant and Loake, 2000). O aumento de SOD (superóxido dismutase) confere tolerância ao estresse oxidativo (Bowler et al. 1992, Slooten et al. 1995, Panda and Khan, 2004).

A SOD constitui uma das primeiras linhas de defesa contra espécies reativas de oxigênio (ROS). O Oxigênio reativo (O_2^-) é produzido em qualquer localização da cadeia transportadora de elétrons e, conseqüentemente, ativa o O_2 em diferentes compartimentos da célula (Eltner 1991), inclusive mitocôndria, cloroplastos, microsomas, glioxissomos, peroxissomos, apoplasto e citosol (Alscher et al. 2002).

A citocromo oxidase é uma enzima terminal na cadeia transportadora de elétrons que catalisa a oxidação ou redução do óxido nítrico (Brudvig et al. 1980). Regula a rota metabólica dessa substância, seja por interação do óxido nítrico com a enzima reduzida formando óxido nitroso (Clarkson et al. 1995, Borutaite and Brown 1996, Palacios-Callender et al. 2007) ou pela interação do óxido nítrico com enzima formando nitrito (Zhao et al. 1995, Torres et al. 1998, Palacios-Callender et al. 2007).

A citocromo oxidase tem a função primária de reduzir centros que necessitam de elétrons a reduzir o oxigênio por meio de quatro elétrons, prevenindo a formação de espécies de oxigênio reativo (Collman et al. 2007).

As peroxidases, na presença de peróxido, catalisam a oxidação de alguns substratos doadores de prótons, tais como monofenóis, difenóis, polifenóis e aminofenóis (Wolf and Fatibello, 2003). As peroxidases são uma família de proteínas que incluem enzimas com origem em mamíferos, fungos e plantas. As de origem de plantas contêm ferriprotoporfirina como grupos prostético e cromóforo responsável pela cor castanha das enzimas. A peroxidase catalisa a

oxidação provocada pelo peróxido de hidrogênio em substratos como ascorbato e o citocromo C. Elas estão relacionadas com os processos de crescimento e diferenciação celular e mudanças morfogenéticas em resposta aos estresses físico, químico e biológico. O aumento da atividade dessa enzima em plantas submetidas a essas condições pode ser fator determinante da capacidade de adaptação, podendo a atividade ser identificada como um marcador bioquímico de estresse (Piza et al. 2003).

A atividade da peroxidase pode ser alterada por fatores externos como luz ou outras radiações, estresse (sais e temperatura), senescência, regulador de crescimento, entre outros. A peroxidase está relacionada com a regulação ou alteração dos níveis endógenos de auxina. A complexidade das respostas dessa enzima tem dificultado o entendimento da função específica *in vivo* e seu papel no crescimento da planta e sua adaptação no ambiente (Gaspar et al. 1994; Rival et al. 1997).

As peroxidases são importantes enzimas das plantas que estão envolvidas em diversas reações, ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa de patógenos, regulação da elongação de células e outras. Peroxidases e polifenoloxidasas lideram a degradação oxidativa de compostos fenólicos próximo ao local da descompartimentalização celular provocada por patógenos (Gaspart et al. 1982, Kao 2003).

O pequi é uma fruta que apresenta potencial anti-oxidante e seu consumo combate os radicais livres formados nas células, portanto, seu consumo além de prevenir doenças causadas pela deficiência em vitaminas A e C é favorável à proteção contra o envelhecimento precoce causado pela liberação de radicais livres nas células.

Os fatores de transcrição encontrados nas análise *in silico* estão relacionados ao gene DOF1 e histona acetiltransferase.

O gene DOF1, é codificador de um fator de transcrição, único em plantas que ativa a expressão de múltiplos genes associados com metabolismo orgânico

de ácidos, incluindo fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) (Yanagisawa 1996, 1998, 2000, 2002, Yanagisawa et al. 2004). Esse produto gênico atua como uma chave regulatória na coordenação da expressão gênica no metabolismo de carbono, além de estar envolvido na regulação da expressão de genes para a luminosidade (Yanagisawa 2001), atuando na atividade fotossintética da planta.

Uma importante modificação pós-traducional de histonas é a acetilação do grupo α -amino em resíduos de lisina conservados na cauda amino-terminal da proteína (Legube and Trouche 2003). A acetilação neutraliza positivamente modificações na lisina e afeta interações de histonas com outras proteínas e/ou DNA (Sternglanz and Schindelin 1999). A acetilação de histonas tem sido associada com ativação transcricional da cromatina (Allfrey et al. 1964, Allis et al. 1985).

As glicosiltransferases (GT) são enzimas que participam da manutenção estrutural das células, pois a glicosilação é uma das mais importantes reações que envolvem os metabólitos secundários e participa da manutenção da homeostase celular, regulação da via de crescimento da planta e resposta contra o estresse ambiental (Jones and Vogt 2001, Lim and Bowles 2004, Wang and Hou 2009). São encontradas, principalmente, em plantas que convertem produtos da fotossíntese em dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos, além de serem moléculas importantes na composição da parede celular (Keegstra and Raikhel, 2001). As GT transferem açúcares únicos ou múltiplos, de nucleotídeos doadores, para uma molécula aceptora menor nas plantas (Bowles et al. 2005, Kim et al. 2006). Moléculas hidroxiladas são as mais comuns aceptoras, enquanto que a UDP-glicose é a mais comum doadora em GT catalisando o grupo glicosil transferindo a reação (Wang and Hou, 2009).

A acetiltransferase fosfinotricina, com o qual sequências do pequi com espinho apresentaram similaridade, catalisa a acetilação da fosfinotricina, um análogo do glutamato, herbicida que exerce efeito fitotóxico nas plantas, por inibição da glutamina sintetase (Hoagland 1999, Gill et al. 2001, Hérout et al. 2005), atuando como forma de resistência da planta. Fosfinotricina é um princípio

ativo de herbicidas que atuam na conversão do ácido glutâmico e amônia em glutamina, resultando na acumulação de íons de amônia na planta e morte celular (Wild and Manderscheid 1984, Hoeven et al. 1994).

Ainda é desconhecido o papel efetivo dessas enzimas na constituição genética do pequizeiro (*C. brasiliense*), no entanto esse estudo abre possibilidades de trabalho acerca da genômica funcional da espécie.

Conclusão

Foram encontradas 972 sequências expressas no pequizeiro obtidas por análise *in silico* de similaridade e a comparação indica que estão relacionadas à estresse oxidativo em plantas, fatores de transcrição e resistência a patógenos.

Conclusões Gerais

- As análises por marcadores RAPD foram eficientes na identificação de polimorfismos que podem ser responsáveis pela ocorrência e ausência de espinho no caroço de pequi.
- Hipótese para presença de espinho no caroço de pequi envolve o estresse oxidativo devido à deficiência de Redutase Férrica.
- Hipótese para ausência de espinho no caroço de pequi envolve a presença de catalase.
- As análises citogenéticas mostraram que não existem alterações de bandeamento e número cromossômico que permitam inferir que a presença ou ausência de espinho estejam relacionados a essas características.
- As metáfases de pequizeiro com e sem espinho no caroço mostraram vários núcleos cromocêntricos.
- Foram identificados, pela primeira vez, região organizadora de nucléolo (RON) em pequizeiro. Não foi possível, nesse estudo, identificar o cromossomo correspondente.

- Provável baixa quantidade de heterocromatina no genoma de pequi, conforme indicado pela marcação com CMA₃ e DAPI.

- Provável elevado nível de concentração gênica, conforme indicado pela marcação com CMA₃.

- Ainda é desconhecido o papel efetivo dos produtos gênicos relativos aos transcritos encontrados do pequi, no entanto nesse estudo foram obtidas sequências expressas que indicam possibilidades de trabalho acerca da genômica funcional da espécie.

- O pequi é uma fruta que apresenta potencial anti-oxidante e seu consumo combate os radicais livres formados nas células, portanto, seu consumo além de prevenir doenças causadas pela deficiência em vitaminas A e C é importante à proteção contra o envelhecimento precoce causado pela liberação de radicais livres nas células.

Referências bibliográficas

ALLFREY V, FAULKNER R and MIRSKY A. 1964. Methods for the purification of thymus nuclei and their application to studies of nuclear protein synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51: 786–794.

ALLIS CD, CHICOINE L, RICHMAN R and SCHULMAN I. 1985. Deposition-related histone acetylation in micronuclei of conjugating *Tetrahymena*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8048–8052.

ALSCHER RG, ERTURK N and HEATH LS. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stresses in plants. Journal of Experimental Botany 53: 1331-1341.

ALTSCHUL SF, GISH W, MYERS EW and LIPMAN DJJ. 1990. Molec. Biol. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215; 403-410.

ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SHAFFER AA, ZHANG J, SHANG Z, MILLER W and LIPMAN DJ. 1997. Grapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25: 3389-402.

BARKASDJIEVA NT, CHROSTOV KN and CHRISTINA KN. 2000. Effect of calcium and zinc on the activity and thermostability of superoxide dismutase. Biol. Plant 43:73-78.

BENSON DA, KARSCH-MIZRACHI I, LIPMAN DJ, OSTELL J and WHEELER DL. 2002. GenBank. Nucleic Acids Research 30: 17-20.

BOGUSKI MS and SHULER GD. 1995. Establishing a human transcript ap. Nature Genetics 10: 369-371.

BORUTAITE V and BROWN GC. 1996. Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide. Biochem J 315:295–299.

BOWLER C, MONTAGU MV and INZE D. 1992 Superoxide dismutase and stress tolerance. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.Biol 43:83-116.

BOWLES D, ISAYENKOVA J, LIM EK and POPPENBERGER B. 2005. Glycosyltransferases: managers of small molecules. Curr Opin Plant Biol 8: 254-263.

BRANDÃO M, CARVALHO PGS and JESUÉ G. 1992. Guia ilustrado de plantas do Cerrado de Minas Gerais. Belo Horizonte: CEMIG.

BRENDEL V, KURTZ S and WALBOT V. 2002. Comparative genomics of Arabidopsis and maize: prospects and limitations. Genome Biology 3:1-1005.

BRUDVIG GW, STEVENS TH and CHAN SI. 1980. Morpholine vapour inhalation and interactions of simultaneous nitrite intake. *Biochemistry* 19:5275–5285.

CLARKSON RB, NORBY SW, SMIRNOV A, BOYER S, VAHIDI N, NIMS RW and WINK DA. 1995. Direct measurement of the accumulation and mitochondrial conversion of nitric oxide within Chinese hamster ovary cells using an intracellular electron paramagnetic resonance technique. *Biochim Biophys Acta* 1243:496–502.

COLLMAN JP, DEVARAJ NK, DECRÉAU RA, YANG Y, YAN YH, EBINA W, EBERSPACHER TA and CHIDSEY CED. 2007. A Cytochrome c Oxidase Model Catalyzes Oxygen to Water Reduction Under Rate-Limiting Electron Flux. *Science* 315: 1565-1568.

ELSTNER EF. 1991. Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. In: PELL EJ and STEFFEN KL. eds. *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, p. 13-25.

GALLEGO SM, BENAVIDES MP and TOMARO ML. 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves:evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci.* 121:151-159.

GASPAR T, KEVERS C and HAUSMAN JF. 1994. Peroxidase activity and endogenous free auxin during adventitious root formation. In: LUMDSEN PJ,

NICHOLAS JR, DAVEIS WJ. Physiology, growth and development of plants in culture. Kluwer Acad. Pub., Dordrecht, p. 289-298.

GASPAR TH, PENEL CL, THORPE T and GREPPIN H. 1982. Peroxidases: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Genève: Université de Genève. 324p.

GILL HS, PFLUEGL GMU and EISENBERG D. 2001. The crystal structure of phosphinothricin in the active site of glutamine synthetase illuminates the mechanism of enzymatic action. *Biochemistry* 40: 1903-1912.

GRANT JJ and LOAKE GJ. 2000 Role of active oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol* 124:21-29.

HENRIGER EP. 1970. Pequiizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) Brasil Florestal, Rio de Janeiro, p.28-31.

HERNANDEZ JA and DEL RIO LA SEVILLA F. 1994 Salt stress induced changes in superoxide dismutase isozymes in leaves and mesophyll protoplasts from *Vigna radiata* (L.) Walp. *New Phytol.* 126: 37-44.

HERNANDEZ JA, JIMENEZ J, MULLINEAUX P and SEVILLA F. 2000 Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long term stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ* 23: 583-862.

HÉROUET C, ESDAILE DJ, MALLYON BA, DEBRUYNE E, SCHULZ A, CURRIER T, HENDRICKX K, KLIS R and ROUAN D. 2005. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory toxicology and Pharmacology* 41: 134-149.

HOAGLAND RE. Biochemical interactions of the microbial phytotoxin phosphinothricin and analogs with plants and microbes. In: CUTLER HG and CUTLER SJ, editors. *Biologically active natural products: agrochemical*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1999, p. 107.

HOEVEN CVD, DIETZ A and LANDSMANN J. 1994. Expression of phosphinothricin acetyltransferase from the root specific par promoter in transgenic tobacco plants is sufficient for herbicide tolerance. *Plant Cell Reports* 14: 165-170.

JONES P and VOGT T. 2001. Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 213: 164-171.

KAO CH. 2003. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. *Plant Growth Regulation* 39:83-89.

KEEGSTRA K and RAIKHEL N. 2001. Plant glycosyltransferases. *Plant Biology* 4: 219-224.

KIM JH, KIM BG, KO JH, LEE Y, HUR HG, LIM Y and AHN JH. 2006. Molecular cloning, expression and characterization of a flavonoid glycosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 10: 256-262.

LEGUBE G and TROUCHE D. 2003. Regulating histone acetyltransferases and deacetylases. *EMBO reports* 4: 944-947.

LEVITT J. 1999. *Plant Responses to Environmental Stress*. Vol.I. Academic Press, London. LOGGINI B, SCARTAZZA A, BRUGNOLI E, NAVARI-IZZO F. (1980) Antioxidant defense system, pigment composition and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiol* 119:1091-1099.

LIM EK and BOWLES D. 2004. A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. *EMBO J* 23: 2915-2922.

LISBOA O. 1931. O pequizeiro. *Boletim de Agricultura Zootécnica e Veterinária*, Belo Horizonte 6:51-55.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO. SECRETARIA DA AGRICULTURA FAMILIAR. *Agricultura familiar na bacia do Xingu no Mato Grosso: conhecendo e construindo alternativas sustentáveis*. 2006. www.mda.gov.br. Acessado em 05 de abril de 2009.

OLIVEIRA E, LONGHI EH, VANDERLEI JC, SILVA ID and ROCHA EV. 2005. Arranjo extrativista do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), na região de Iporá-Goiás: sustentabilidade e dinâmica da comercialização. In: XLIII Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural Ribeirão Preto – SP, 16p.

OLIVEIRA MM, SAMPAIO RP, GIORGI W, GILBERT B and MORS W. 1970. *Caryocar brasiliense* – Isolamento e identificação de algumas substâncias: atividade biológica sobre o sarcoma 180. Arquivos do Instituto Biológico 37:25-27.

PALACIOS-CALLENDER M, HOLLIS V, MITCHISON M, FRAKICH N and MONCADA S. 2007. Cytochrome c oxidase regulates endogenous nitric oxide availability in respiring cells: A possible explanation for hypoxic odilation. Proc. Natl. Acad. Sci 104: 102-107.

PANDA SK and KHAN MH. 2004. Changes in growth and superoxide dismutase activity in *Hydrilla verticillata* L. under abiotic stress. Braz. J. Plant Physiol 16:115-118.

PIZA IMT, SIUSEPPINA PP and BRASIOR OG. 2003. Atividade de peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. R. Bras. Agrociência 9: 361-366.

RIVAL A, BERNARD F and MATHIEU Y. 1997. Changes in peroxidase activity during in vitro rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Scientia Horticulturae 71: 103-112.

RONNING CM et al. 2003. Comparative analyses of potato expressed sequence tag libraries. *Plant Physiology* 131: 419-29.

RUDD S. 2003. Expressed sequence tags alternative or complement to whole genome sequences? *Trends in Plant Science* 8:321-329.

SCANDALIOS JG. 1993 Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol* 101:7-12.

SLOOTEN L, CAPIAU K, VAN CAMP W, VAN MONTAGU M, SYBESMA C and INZE D. 1995 Factors affecting the enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing manganese superoxide dismutase in the chloroplasts. *Plant Physiol* 107:373-380.

SOUZA-JÚNIOR MT et al. 2005. Transcriptoma de *Musa acuminata* NO DATA *Musa*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 109. EMBRAPA. Brasília. 22p.

STERNGLNZ R and SCHINDELIN H. 1999. Structure and mechanism of action of the histone acetyltransferase Gcn5 and similarity to other N-acetyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci* 96: 8807-8808.

TATUSOV RF et al. 2003. The COG database: an updated version includes eukaryotes. *Bioinformatics* 4: 1-14.

TORRES J, COOPER CE and WILSON MT. 1998. J Biol Chem 273:8756–8766.

WANG J and HOU B. 2009. Glycosyltransferases: key players involved in the modification of plant secondary metabolites. Front. Biol. China 4: 39-46.

WECKX JEJ and CILJSTERS HM. 1997. Zn phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiol.Biochem. 35:405-410.

WILD A and MANDERSCHIED R. 1984. The effect of phosphinothricin on the assimilation of ammonia in plants. Z. Naturforsch 39: 500-504.

WOLF LD and FATIBELLO OF. 2003. Atividade, Extração e Purificação das Enzimas Polifenol Oxidase e Peroxidase de Vegetais. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luis km 235, São Carlos/SP.

YANAGISAWA S. 1996. Dof DNA binding domains contain a novel zinc finger motif. Trends Plant Sci 1: 213–214.

YANAGISAWA S. 2000 Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. Plant J 21: 281–288.

YANAGISAWA S. 2002. The Dof family of plant transcription factors. Trends Plant Sci 7, 555–560.

YANAGISAWA S. 2001. Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *Plant J* 21: 281-288.

YANAGISAWA S, KISAKA AA, UCHIMIYA H and MIWA T. 2004. Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: Improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci* 101:7833–7838.

YANAGISAWA S and SHEEN J. 1998. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Plant Cell* 10, 75–89.

ZHANG J and KIRKHAM MB. 1994 Drought-stress induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidases in wheat leaves. *Plant Cell Physiol* 35:785-791.

ZHAO XJ, SAMPATH V, CAUGHEY WS 1995 *Biochem Biophys Res Commun* 212:1054–1060.