



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CÍNTIA CARLA CLAUDINO GRANGEIRO

DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÃO DE *Portulaca umbraticola*
ACESSADA POR MARCADOR RAPD

AREIA

2019

CÍNTIA CARLA CLAUDINO GRANGEIRO

DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÃO DE *Portulaca umbraticola*
ACESSADA POR MARCADOR RAPD

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Universidade Federal da
Paraíba como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mailson Monteiro do Rêgo

AREIA

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

G757d Grangeiro, Cinthia Carla Claudino.

DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÃO DE *Portulaca*
umbraticola ACESSADA POR MARCADOR RAPD / Cinthia Carla
Claudino Grangeiro. - Areia, 2019.

33 f.

Orientação: Mailson Monteiro do Rêgo.
Monografia (Graduação) - UFPB/CCA.

1. Variabilidade. 2. Análise Molecular. 3. Ornamental.
I. Rêgo, Mailson Monteiro do. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

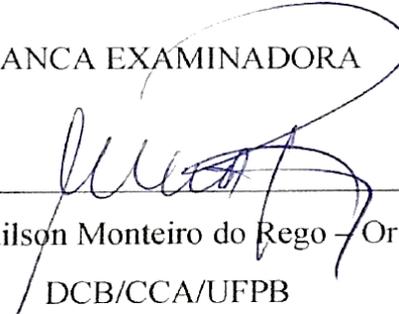
CÍNTHIA CARLA CLAUDINO GRANGEIRO

DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÃO DE *Portulaca umbraticola*
ACESSADA POR MARCADOR RAPD

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Universidade Federal da
Paraíba como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Aprovado em 07 de junho de 2019.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Mailson Monteiro do Rego - Orientador
DCB/CCA/UFPB



Dra. Carliane Rebeca Coelho da Silva
PNPD-UFRPE/Embrapa Algodão



Msc. Cristine Agrine Pereira dos Santos
Doutoranda do PPGAgro/CCA/UFPB

Dedicatória

Dedico este trabalho a toda a minha família, principalmente a minha mãe, meu maior exemplo de como ser uma pessoa guerreira, a meu pai, e minha irmã, para que ela siga o bom exemplo de sua irmã (eu).

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente a Deus, por ter me concedido saúde e forças todos os dias para chegar onde estou hoje.

A minha mãe Cláudia, a meu pai Carlos, e a minha irmã Cecília, por todo o apoio dado durante esses 4 anos, sem ele eu não teria chegado aqui. A minha vó paterna Dalva, minha madrinha Rosa, meu padrinho Sebastião que tanto me ajudaram, e tias e tios que são muitos, mas estão todos em meu coração!

A UFPB pela oportunidade de poder fazer parte de seu alunado, como também todos os programas de financiamento: PRAPE, PRAC, CAPES e CNPq, pois sem esse apoio a caminhada teria sido mais difícil e não teria conduzido os experimentos.

Ao meu orientador, Prof. Mailson Monteiro do Rêgo, grande mestre que tive o prazer de ter conhecido e poder trabalhar junto, sou agradecida por ter aceito a orientação e não ter desistido de mim, meu sincero obrigada!

Aos professores que tive durante toda a caminhada, em especial a Prof^a Márcia Miranda, que foi primeira orientadora e muito me ensinou, agradeço por me mostrar a essencialidade de trabalhar com extensão. A Prof^a Carliane Rebeca por me fazer ver a biologia molecular com outros olhos. Ao Prof^o Daniel Duarte, que é um grande entendedor de todas as coisas, e que muito do que aprendi devo a ele. Por fim, a David Holanda que é um professor admirável em tudo o que faz, e emociona repassando seu assunto transbordando de alegria e fervor.

A todos do laboratório de Biotecnologia Vegetal, que me receberam tão bem, principalmente a Jardel, meu estagiário que trabalhou arduamente comigo no início de tudo, a Cristine que esteve comigo em todos os momentos de minha pesquisa, até nos momentos difíceis em que tudo parecia dar errado, e a Rubens, que sempre ajudava na descontração, mas também teve sua cooperação na pesquisa.

A cidade de Areia (PB), que se tornou minha cidade de coração, e que a todos recebe com tanto amor e seu clima agradável de brejo, e não posso deixar de agradecer a existência e boa funcionalidade do Hospital Municipal, pois o que seria de mim sem ele para me socorrer nas crises de rinite?! (risos).

A minha turma de bacharel 2015.1, que sempre tornou as aulas mais divertidas, e que sempre foi tão unida em tudo que fez, Davy meu primeiro e eterno amigo, Ana Rita e Nilmara, que sempre estiveram ali pra o que precisasse. Matheus que sempre estava numa “vibe boa”. Thamisis que falarei mais em breve e Clarissa, que nos deixou para seguir seu sonho. Aos amigos licenciados que também residem em meu coração. Dudu que sofreu junto comigo para pagar matemática, mas vencemos! Alysson, que sempre estava animando tudo. Renan com sua grande inteligência e humildade, que nunca negou ajuda a ninguém. Lucas, que a exemplo de Alysson, nunca para quieto. E, finalmente, Muriel, a animação em pessoa!

A Thamisis e Clarissa tenho muito o que agradecer, pois as mesmas foram responsáveis por enxugar muitas de minhas lágrimas no início do curso (época difícil para mim), e na dificuldade das disciplinas, foram muitas noites de estudo e de descontração, nunca esquecerei!

Thamisis esteve comigo o tempo todo, nas horas boas, mas também nas difíceis, sempre me ouvindo sem reclamar, e quase sempre sabia as palavras certas a dizer, sem ela, esses 4 anos não teria tido tanta graça, pois de quem eu iria rir dos “tropicões” descendo as ladeiras? Te amo amiga.

Laís, já chegou no finalzinho do seu curso, mas sinto como se fosse há muitos anos, ela apareceu num momento muito difícil, que o meu namorado e o dela, ficariam 3 meses longe... é, foram longos 3 meses de sofrência e cerveja. Que ao invés de enxugar as lágrimas, chorávamos juntas. Te amo também.

Kagiaany que conheci já em meu finalzinho aqui, mas que foi conquistou boa parte de meu coração, aquela que nunca foi capaz de negar uma ajuda, e sempre estava a meu lado sempre que precisei.

Aos meninos da agronomia que conquistei uma amizade tão boa, Fidelis, Misael, Henrique, Alan e Edson, cada um com sua essencialidade.

Aos agregados da licenciatura, Mércia, Pricilla, Rogério, entre outros.

Ao meu namorado, companheiro e amigo José Alfredo Nunes eu tenho muito o que agradecer, pois antes de todos, foi ele quem esteve ao meu lado por 3 anos de curso me apoiando em tudo, sem ele tudo teria sido mais difícil, eu poderia escrever inúmeras laudas a respeito de meu amor por ele, mas deixaria de ser uma monografia e se tornaria um conto de amor. Eu te amo!

Lista de figuras, tabelas, símbolos

Figura 1. Acessos (18) de <i>Portulaca umbraticola</i> utilizados no experimento. (a) PU-1, (b) PU-2, (c) PU-3, (d) PU-4, (e) PU-5, (f) PU-6, (g) PU-7, (h) PU-8, (i) PU-9, (j) PU-10, (k) PU-11, (l) PU-12, (m) PU-13, (n) PU-14, (o) PU-15, (p) PU-16, (q) PU-17 e (r) PU-18.	19
Figura 2. Acessos (18) de <i>P. Umbraticola</i> imersos em água destilada e indução de raiz e posterior extração de DNA.	20
Figura 3- Perfil eletroforético de DNA genômico em gel de agarose dos 18 indivíduos de <i>P. Umbraticola</i> a partir de raízes. Somente os acessos 2, 4, 12 e 17 não foi possível extrair o DNA, neste ensaio.	23
Figura 5. Produtos de amplificação de RAPD gerados com o iniciador MEP 06 em 18 indivíduos de <i>P.umbraticola</i>	24
Figura 6. Dendrograma construído por meio do método WARD. D2, com base na matriz de dissimilaridade genética entre indivíduos de <i>P. umbraticola</i> a partir de 14 iniciadores RAPD.	28
Tabela 1 - Iniciadores de RAPD e suas respectivas sequências no sentido 5' - 3'.	22
Tabela 2 - Iniciadores RAPD, número de bandas amplificadas, locus polimórficos e monomórficos e de polimorfismo em indivíduos da espécie <i>Portulaca umbraticola</i>	24
Tabela 3. Matriz de dissimilaridades genéticas entre 18 indivíduos de <i>P. umbraticola</i> usando a distância binária de Sokal.	26
Tabela 4. Agrupamento dos 18 acessos de <i>P. Umbraticola</i> baseado no método de otimização de Tocher.	29
Tabela 5. Correlação cofenética baseado nos dados moleculares (RAPD) avaliados de 18 acessos.	29

Resumo

A espécie *Portulaca umbraticola* tem sua utilização como ornamental, principalmente em casas e jardins, pois possui flores com grande diversidade fenotípica entre seus indivíduos, estas variações estão inteiramente ligadas a seu genótipo, portanto é de suma importância avaliar a diversidade genética da espécie, para realizar cruzamentos e obter novas cultivares. O objetivo do trabalho foi analisar a diversidade genética da *P. umbraticola* utilizando marcador RAPD. O estudo foi realizado no laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, e utilizou 18 acessos da espécie *P. umbraticola* oriundos da cidade de Areia/PB e João Pessoa/PB. Para a extração do DNA foi utilizado tecido proveniente de raiz de cada indivíduo, seguindo do protocolo de Doyle e Doyle, para as reações de PCR foi usado um total de 14 iniciadores RAPD. As bandas discretas de DNA geradas, foram responsáveis pela criação de uma matriz binária, a partir de qual foi construída a matriz de dissimilaridade utilizando a distância genética binária de Sokal, e o agrupamento utilizando o método de Ward.d2 por meio de dendrograma. Todas as bandas amplificadas indicaram polimorfismo entre os 18 acessos, totalizando 100% de polimorfia, a maior distância entre os acessos foi de 0,7661 entre o PU-12 e PU-16, através do dendrograma foi possível a formação de 3 grupos distintos, já no agrupamento de Tocher foram formados 6 agrupamentos. Considerando a matriz de dissimilaridade, é sugerido cruzamentos entre os acessos 12 e 16 por possuírem a maior distância genética entre os acessos.

Palavras-chave: Variabilidade, Análise molecular, Ornamental.

Abstract

The species *Portulaca umbraticola* has its use as ornamental, mainly in houses and gardens, because it has flowers with great phenotypic diversity among its individuals, these variations are entirely related to its genotype, therefore it is of utmost importance to evaluate the genetic diversity of the species to perform crosses and obtain new cultivars. The objective of this work was to analyze the genetic diversity of *P. umbraticola* using RAPD marker. The study was carried out in the plant biotechnology laboratory of the Agricultural Sciences Center of the Federal University of Paraíba, and used 18 accesses of *P. umbraticola* from the city of Areia/PB and João Pessoa/PB. For the extraction of the DNA was used tissue from the root of each individual, following the protocol of Doyle and Doyle, for the PCR reactions a total of 14 RAPD primers were used. The discrete DNA bands generated were responsible for the creation of a binary matrix, from which the dissimilarity matrix was constructed using the binary genetic distance of Sokal, and the clustering using the method of Ward.d2 by dendrogram. All amplified bands indicated polymorphism between the 18 accessions, with a total of 100% polymorphism, the highest distance between the accessions was 0.7661 between PU-12 and PU-16, through the dendrogram it was possible to form 3 distinct groups, already in the cluster of Tocher 6 groups were formed. Considering the matrix of dissimilarity, it is suggested crosses between accesses 12 and 16 because they have the greatest genetic distance between the accessions.

Keywords: Variability, Molecular Analysis, Ornamental.

Sumário

1. Introdução.....	12
2. Objetivos	13
2.1 Objetivos Geral	13
1.2 Objetivos específicos	13
3. Revisão bibliográfica.....	13
3.1 Botânica da <i>Portulaca</i>	13
3.2 Diversidade genética.....	15
3.3 Uso de marcador RAPD	16
3.4 Melhoramento de plantas ornamentais	17
4. Metodologia	19
4.1. Área de estudo e preparo do material	19
4.2 Extração do DNA.....	20
4.3 Quantificação do DNA	21
4.4 Reação de PCR usando marcador RAPD	21
5. Resultados e discussão	23
6. Conclusão.....	29
REFERÊNCIAS	30

1. Introdução

A espécie *Portulaca umbraticola* foi primeiramente descrita em por Kunth (1823), e posteriormente, também identificada por outros pesquisadores, onde ela é sempre citada por possuir grande plasticidade fenotípica, o que a faz ser muitas vezes confundida com a espécie *P. oleracea*, porém já se sabe que a *P. umbraticola* é determinada pela ala membranácea que possui em seu fruto (LEGRAND, 1962).

Por serem de pequeno porte e possuir uma variação na coloração de suas flores, o que as tornam vistosas, esta espécie possui um grande potencial para uso ornamental, Franca (2008) afirmou que no Brasil o mercado de ornamentais vem crescendo e tornando-se uma possibilidade de emprego de grande relevância, geralmente esta atividade é voltada para pequenos produtores rurais, melhorando a distribuição de renda.

É de suma importância a avaliação da diversidade genética das espécies do gênero *Portulaca* para iniciar um programa de melhoramento genético, possibilitando assim, a produção de cultivares através de cruzamentos, que possam competir com espécies que já estão no mercado.

O estudo da diversidade genética, é uma atividade de grande relevância para o melhoramento de plantas, e também para a conservação de muitas espécies. Para analisar a diversidade genética de cultivares, é importante que se use utilize de marcadores moleculares, pois estes podem servir para direcionar progenitores para cruzamentos, confirmar novos híbridos, ou até mesmo identificar novos genótipos para fins comerciais (BERNET et al., 2003; BOLARIC et al., 2005). O marcador RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), descrito por William et al. (1990) é um marcador de grande utilidade para estimar a diversidade de diversas populações, e é vantajoso por ser de baixo custo, e necessitar de pequenas quantidades de DNA.

Em função da grande variabilidade fenotípica de *P. umbraticola*, espera-se que a mesma também possua grande diversidade genética entre seus genótipos, e trabalhos que visam avaliar essa diversidade assume grande importância, particularmente na escolha de genitores para a produção híbridos em programas de melhoramento.

É de suma importância se ter conhecimento sobre técnicas para poder realizar o melhoramento, pois algumas espécies apresentam particularidades (TOMBOLATO, 2004). A *P. Umbraticola*, por exemplo, possui folhas carnosas e ricas em polissacarídeo, o que dificulta

a extração do seu DNA a partir de material foliar, impossibilitando as reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) (CHIARI, 2009).

Notado o potencial que a *P. umbraticola* tem para uso ornamental, e a escassez de trabalhos voltados para sua diversidade genética, fez-se necessário a realização deste trabalho para obter resultados que venha gerar subsídios para programas de melhoramento genético, e conseqüentemente, pequenos produtores e empresas que venham ter acesso a esses híbridos.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Geral

O referido trabalho tem por objetivo avaliar a diversidade genética de *Portulaca umbraticola* acessada por marcador RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA).

1.2 Objetivos específicos

- Isolar o material genético da *P. Umbraticola*;
- Realizar reações de PCR usando o marcador RAPD;
- Avaliar a diversidade genética dos acessos de *P. Umbraticola*.

3. Revisão bibliográfica

3.1 Botânica da *Portulaca*

A família Portulacaceae, descrita por Juss. (1789) possui 30 gêneros e cerca de 500 espécies com ampla distribuição no Oeste da América do Norte, América do Sul, e África, tendo pouca representação na Europa e Ásia. No Brasil, o gênero desta família que mais se destaca é o *Portulaca*, que em sua taxonomia apresenta plantas herbáceas carnosas, podendo ser anuais ou perenes, folhas alternas e a inflorescência em cimeira, variando de 4 a 5 pétalas livres, 2 sépalas, numerosos estames coloridos, ovários ínfero e o fruto em cápsula com deiscência longitudinal ou transversal. (COELHO E GIULIETTI, 2010).

O número de espécies que há no gênero *Portulaca* ainda é incerto, pois o gênero apresenta uma diversa variedade morfológica, tornando a taxonomia complexa. Geesink (1969) definiu 40 espécies para o gênero, Legrand (1962) reconheceu 62, Willis (1966) cerca de 200, Carolin

(1993) e Egli e Ford-Werntz (2002), aproximadamente 115 espécies. Atualmente segundo Nyffeler; Egli (2010) há 116 espécies descritas.

Em território brasileiro, Coelho e Giuliett (2010), descreveram 13 espécies ocorrentes: *P. grandiflora*, *P. pilosa*, *P. hatschbachii*, *P. werdermannii*, *P. friedeana*, *P. halimoides*, *P. elatior*, *P. minensis*, *P. hirutissima*, *P. umbraticola*, *P. oleracea*, *P. mucronata*, e por fim *P. amilis*. Ainda que as espécies apresentem uma diversa variação morfológica, Applequist e Wallace (2001), após realizar uma análise filogenética afirmaram, que o gênero *Portulaca* é monofilético.

As *Portulacas* são plantas heliófilas, ou seja, sua distribuição dá-se principalmente em lugares luminosos, sendo facilmente encontradas em regiões de savana, estepes, pastos, e ao longo de margens de rodovias. Algumas espécies do gênero são bioindicadoras de salinidade, devido serem tolerantes a mesma, e têm preferência por climas tropicais. Suas aptidões, possibilitam invadirem os mais diversos habitats, podendo ser consideradas plantas ruderais, e até mesmo, serem denominadas plantas daninhas em áreas de cultivo (GEESINK, 1969).

A espécie *Portulaca umbraticola* foi descrita pelo pesquisador Kunth (1823), onde o mesmo a descreveu com caule ramoso, folhas lanceoladas, tricomas axilares quase inexistente, flores rosas, ovário ínfero, fruto membranáceo, entre outras características, essa espécie é bastante caracterizada por conter uma ala membranosa ao redor de seu fruto, chegando algumas vezes em cobrir o opérculo, esta particularidade até o momento só é descrita para esta espécie no Brasil (COELHO E GIULIETTI, 2010).

Rodrigues e Furlan (2002), observaram que as flores da *P. umbraticola* podem ser amarelas, brancas, salmão, cobre ou vermelho-alaranjadas. Posteriormente, Coelho e Giulietti (2010), afirmaram também que as cores podem variar de amarelo, até branco, rosa, púrpura ou tons de alaranjado. Esta variação que ocorre em relação as cores é associada com a distribuição geográfica onde estas espécies ocorriam, esta ainda é muitas vezes confundida com a espécie *P. oleracea*, contudo, em uma detalhada análise, nota-se que alguns caracteres distinguem os dois táxons, como a ala membranácea do fruto em *P. umbraticola*, este que é um caractere de suma importância para delimitar a espécie, e também a morfologia do botão floral, flores maiores e fruto em *P. oleracea* (LEGRAND, 1962).

3.2 Diversidade genética

De acordo com a Convenção da Diversidade Biológica (CDB), Biodiversidade é definida como a “variabilidade de organismos vivos de todas as origens, compreendendo, dentre outros, os ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos de que fazem parte; compreendendo ainda, a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas” (BRASIL, 2015).

O acúmulo de variações hereditárias no decorrer das gerações resulta em uma imensa variedade de formas, ou seja, a biodiversidade é a resposta da evolução biológica, desta forma é notório que todas as formas de vida existente no planeta se caracterizam por variações genéticas, estas que são usadas para estudo de conservação ou melhoramento genético (SANTOS, 2009).

É a partir da constituição gênica de indivíduos da mesma espécie que se é caracterizada a estrutura genética das populações, esta que sofre diversas influências, principalmente, de interações entre mecanismos evolutivos ou ecológicos, que são responsáveis por promover muitas vezes a diversidade genética (NEPOMUCENO, 2017).

São inúmeras as pesquisas que vêm sendo realizadas acerca da diversidade genética de recursos vegetais, e se devem principalmente, às tecnologias modernas da genética e biologia molecular, através da técnica do DNA recombinante, da reação em cadeia da polimerase (PCR) e do sequenciamento do DNA, tem sido possibilitado o desenvolvimento de marcadores moleculares aptos a detecção de polimorfismo genético, sendo utilizados para identificação, caracterização e avaliação dos recursos genéticos (FALEIRO, 2007).

Um importante parâmetro utilizado para estimar a diversidade genética de uma população se dá pelo número de alelos por loco, pois através dessa estimativa é possível escolher as populações que participarão de programas de melhoramento ou conservação, pois quanto maior o número de alelos, maior a diversidade genética entre os indivíduos, e conseqüentemente maior a chance de se obter combinações genotípicas propícias para o melhoramento genético (PETIT et al., 1998), pois para programas de melhoramento, a caracterização da diversidade genética é fundamental para a seleção de genitores, visto que o melhorista, necessita identificar plantas que possuem genes desejáveis (BRAMMER, 2002).

Hamrick (1983), afirma que estudos de variabilidade genética de populações devem ser conduzidos para quantificar a variação, como também para a caracterização dos níveis de variabilidade das populações, pois para a flora, o tamanho da população, a distribuição

geográfica, seu modo de reprodução, sistema de dispersão de sementes e o tipo de comunidade no qual ela está inserida, são fatores cruciais na influência da distribuição da variabilidade genética.

Dessa maneira, a variabilidade genética é de extrema importância para a obtenção de êxito na seleção das espécies utilizadas pelo homem para produção ornamental, e ajuste de genótipos ao ambiente, se não houver a variabilidade e interação com o meio torna-se impossível obter genótipos divergentes por meio do melhoramento genético (BARBOSA-NETO E BERED, 1998).

3.3 Uso de marcador RAPD

O uso de marcadores moleculares é de suma importância para estimar a diversidade genética e selecionar genótipos. Atualmente, há um número considerável de diferentes marcadores, onde a escolha de um ou outro sendo dependente de alguns fatores, como dos recursos tecnológicos e financeiros disponíveis. Em alguns marcadores é necessário que seja previamente realizado um sequenciamento do genoma, mas também há marcadores de sequência arbitrária que dispensa a realização do teste, e que podem ser realizados rápido e facilmente, principalmente para analisar diversidade genética de recursos vegetais (VELASCO-RAMÍREZ et al., 2014).

O RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) é uma técnica que utiliza de um oligonucleotídeo sintético para iniciar o processo de amplificação. A técnica foi proposta por Williams et al. (1990) para gerar marcadores moleculares polimórficos, onde o polimorfismo é demonstrado por meio de presença ou ausência de bandas discretas de DNA. O RAPD é muito aplicado para avaliação da diversidade genética em populações naturais, como também de caracterização de coleções de germoplasma (REIS; GRATTAPAGLIA, 2003).

Ao obter as bandas discretas do DNA, os genótipos dos indivíduos podem ser avaliados como semelhantes, ou diferentes geneticamente, o resultado é dado principalmente através de matrizes de similaridade, ou dissimilaridade, sendo interpretada por métodos de agrupamento estatísticos (LANZA, 2000).

As principais vantagens desse marcador, são dadas por sua simplicidade, rápida obtenção dos dados, baixo custo quando comparada a outras técnicas, e demandar de pouca quantidade de DNA, e principalmente dispensar o uso de sondas radioativas (CAIXETA et al., 2006).

Marcadores RAPD já foram utilizados em plantas ornamentais com o intuito de avaliar a sua variabilidade genética, como por exemplo em astromélia (ANASTASSOPOULOS E KEIL, 1996), crisântemo (WOLFF E PETERS-VAN RIJN, 1993), rosa (TORRES et al., 1993), lírio (YAMAGISHI, 1995), gérbera (DA MATTA et al., 2009), entre outras.

Sendo assim, a utilização de marcadores moleculares pode contribuir para a análise da divergência genética entre indivíduos da *P. umbraticola*, tendo como principal característica fenotípica, a cor da flor, para obter sugestões de progenitores indicados ao cruzamento.

A escolha dos progenitores é uma etapa de grande significância para programas de melhoramento genético, principalmente quando a finalidade é ornamental, portanto, os marcadores moleculares tornam-se de suma importância para fornecer as informações genéticas necessárias e detalhadas dos genótipos (BORÉM, 1997), podendo direcionar cruzamentos, confirmar a presença de um novo híbrido, como também identificar novos genótipos para fins comerciais (BERNET et al., 2003; BOLARIC et al., 2005).

3.4 Melhoramento de plantas ornamentais

No Brasil a história com flores ornamentais é conhecida a partir dos anos 50, costume esse advindo de holandeses principalmente para Região Sudeste, e foi tomando lugar no mercado a partir de então, sendo responsável por movimentar em 2013 cerca de R\$ 5,22 bilhões da economia do país, em uma pesquisa realizada sobre plantas ornamentais no Brasil (JUNQUEIRA, 2014). Esses mesmos autores, analisaram o crescimento do agronegócio voltado para plantas ornamentais, e afirma que este negócio está conquistando cada vez mais uma alta posição no ramo, e possibilitando a geração de renda e empregos para pequenos e microempreendedores do país.

Com o crescimento e dinamismo do mercado de plantas ornamentais, faz-se necessário o constante lançamentos de novidades, e para suprir essa necessidade um programa de melhoramento de plantas é imprescindível para obter plantas diferentes das que já estão disponibilizadas no mercado e que possam ser competitivas (FILLIETTAZ, 2007).

O melhoramento de uma cultivar pode envolver suas diversas características, dependendo da escolha de interesse do melhorista, para plantas ornamentais um caráter de importância a se considerar é o tamanho, cor, quantidade e duração das flores na planta, estas

que podem ser impostas a cruzamentos entre plantas que tenham caracteres de interesse, através de estudos de análises genéticas da cultivar (FILLIETTAZ, 2007).

Há espécies com grande valor ornamental que sofrem com o extrativismo por falta de estudo de técnicas apropriadas para seu cultivo e propagação, também pode-se citar outras ornamentais como bromélias e helicônias, que são exploradas indiscriminadamente, mas com o advento das tecnologias, principalmente de cultura de tecidos, tem sido possível a domesticação de algumas espécies (TOMBOLATO, 2004).

O Instituto Agronômico de Campinas foi responsável em 2016 pelo lançamento de 5 novas cultivares ornamentais, que são o gengibre ornamental, possuindo uma cor amarelo vibrante, que difere do vermelho tradicional, e com a flor durando mais de uma semana na água. As demais são variedades de bastão-do-imperador. As duas espécies são de bom valor comercial, principalmente no Nordeste brasileiro, de onde são exportadas (NUNES, 2016).

Diversas espécies do gênero *Portulaca* são descritas como ornamentais, Siviero (2014) identificou duas espécies usadas como ornamental e medicinal em quintais urbanos na cidade de Rio Branco/AC. Teles (2013), fez um estudo sobre plantas invasoras onde mais uma vez é identificada indivíduos do gênero, com uso ornamental, comestível e medicinal. No estado da Paraíba, Silva (2012), a descreve como componente florístico de área de caatinga alocada especificamente em áreas de borda, mais recentemente, Machado (2015), descreveu o gênero como ocorrente em sítios antropizados na cidade de João Pessoa/PB. Espécies da família Portulacaceae tem grande potencial como planta ornamental e medicinal.

Sendo assim, a espécie *P. umbraticola* altamente indicada para estudos de diversidade genética, para uma melhor análise, e escolha de genitores que possam ser cruzados e possivelmente, gerar novas cultivares com uso ornamental.

4. Metodologia

4.1. Área de estudo e preparo do material

O experimento foi desenvolvido no laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal da Paraíba, no Centro de Ciências Agrárias/Campus II, na cidade de Areia/PB, mesorregião do agreste e microrregião do Brejo paraibano.

Foram utilizados 18 genótipos da espécie *Portulaca umbraticola*, que foram selecionados devido a sua plasticidade fenotípica e seu potencial uso como planta ornamental. Os acessos foram coletados nas cidades de Areia/PB e João Pessoa/PB e mantidas em vasos em área externa do laboratório, onde receberam todos os tratos culturais. Os acessos são PU-1, PU-2, PU-3, PU-4, PU-5, PU-6, PU-7, PU-8, PU-9, PU-10, PU-11, PU-12, PU-13, PU-14, PU-15, PU-16, PU-17 e PU-18 (Figura 1).

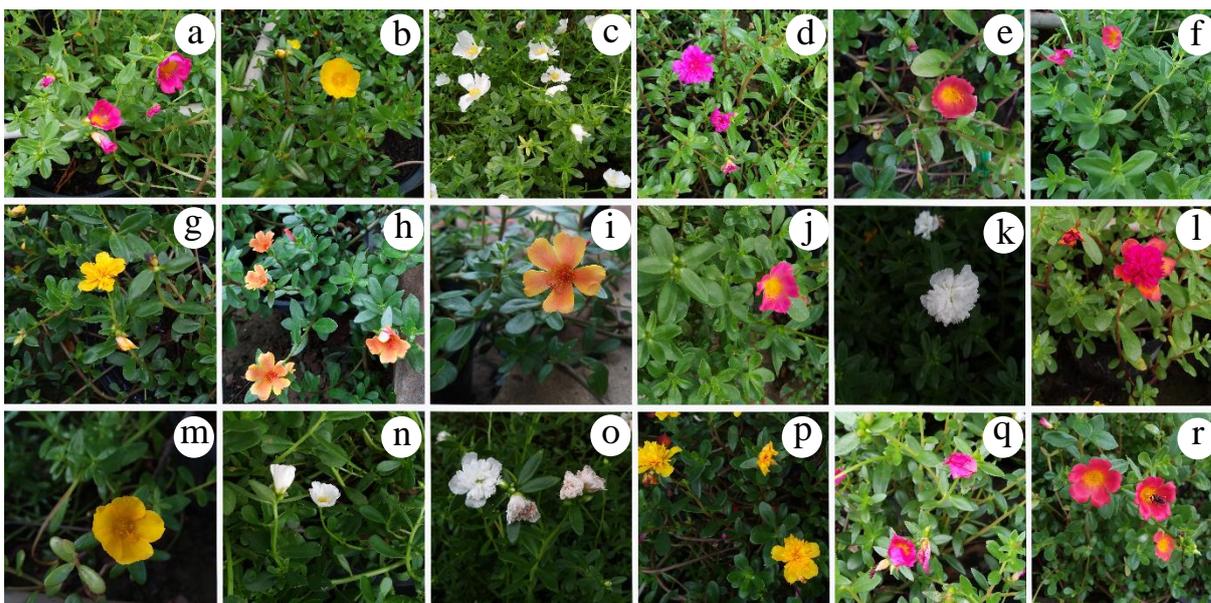


Figura 1. Acessos (18) de *Portulaca umbraticola* utilizados no experimento. (a) PU-1, (b) PU-2, (c) PU-3, (d) PU-4, (e) PU-5, (f) PU-6, (g) PU-7, (h) PU-8, (i) PU-9, (j) PU-10, (k) PU-11, (l) PU-12, (m) PU-13, (n) PU-14, (o) PU-15, (p) PU-16, (q) PU-17 e (r) PU-18.

Para a realização do experimento foi necessário a obtenção de raízes devidamente limpas, para isto foram providenciados potes de vidro devidamente identificados com o número do genótipo, e colocados 3 ramos de cada indivíduo para que emitissem raízes, após 10 dias, as raízes estavam em quantidade suficiente para o prosseguimento do experimento, as raízes emitidas foram coletadas e armazenadas em envelopes de papel alumínio e acondicionadas no freezer até o momento da extração do DNA (Figura 2).



Figura 2. Acessos (18) de *P. Umbraticola* imersos em água destilada e indução de raiz e posterior extração de DNA.

4.2 Extração do DNA

Antes da extração do DNA das raízes, estas foram submetidas ao processo de desinfestação em hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos, para eliminar possíveis microrganismos. Após o enxague do material em água destilada (três vezes), o excesso de água foi retirado com auxílio de papel toalha.

Para a extração do DNA foi utilizado cerca de 200 mg das raízes, – uma vez que as folhas da espécie são suculentas, dificultando a extração do material genético – as quais foram maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de cadinho e pistilo, o material macerado foi transferido para microtubos de 1,5 ml, para a extração de DNA foi seguido o protocolo de Doyle e Doyle (1987) com modificações.

Nos microtubos contendo as amostras, foram adicionados 700 μ L de tampão de extração CTAB 2% (c/ β -mercaptoetanol). Este material foi incubado a 65°C por 30 minutos, sendo agitado suavemente a cada 10 minutos, posteriormente, foram adicionados 600 μ L de CIA [Clorofórmio: álcool isoamílico na proporção 24:1(v/v)], agitado e centrifugado a 13.400 rpm (rotação por minuto) por 10 minutos.

O sobrenadante (600 μ L) foi transferido para um novo tubo devidamente identificado e adicionado igual volume de CIA. O material foi agitado por um minuto e centrifugado a 13.400 rpm por 5 minutos.

Novamente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo (400 μ L). Em seguida, 40 μ L do volume do tampão de lavagem (10g CTAB; NaCl 1,4 M 8,4g e 100ml destilada) foram adicionados, sendo as amostras homogeneizadas por inversão durante 5 minutos. Foram adicionados 500 μ L CIA e centrifugado a 13.400 rpm por 5 minutos. O sobrenadante (280 μ L)

foi transferido para um novo tubo, e os ácidos nucléicos foram precipitados pela adição de 185µL de isopropanol ou (álcool isopropílico) gelado, e centrifugado a 13.400 rpm por 5 minutos (após estas etapas o pellet não era visível, portanto houve a necessidade de deixá-lo a -20°C por 2 horas para o aparecimento do mesmo, e prosseguir com o protocolo).

Foi feito o descarte do sobrenadante, e o precipitado, lavado duas vezes com 500µL de etanol a 70% e uma vez com etanol a 95%, para retirada de sais presentes (entre cada lavagem, o material foi centrifugado a 13.400 rpm durante 5 minutos). Após o descarte do último sobrenadante, o material foi seco em condições naturais até que o etanol fosse removido. Em seguida, o material foi ressuspendido em 60µL de solução TE (Tris-EDTA – 10mmol.L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8,0).

4.3 Quantificação do DNA

Para a obtenção de uma estimativa da quantidade e integridade do DNA extraído, o material foi submetido ao processo de eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado em solução de brometo de etídeo (0.2mg.L⁻¹). Onde 10µL das amostras de DNA foram misturadas com 3µL do azul de bromofenol, e foram inseridas em poços no gel. A corrida de eletroforese foi realizada em tampão TAE 1X (Tris-acetato 0,04 M e EDTA 1 mM), a 100 volts, e o gel foi fotografado sob luz UV, em fotodocumentador Gel logic 112.

4.4 Reação de PCR usando marcador RAPD

Para as reações de amplificação do PCR (*Polymerase Chain Reaction*), foram utilizados 14 iniciadores RAPD (Tabela 1), o volume final para cada amostra da reação foi de 25µl, onde 23µl era constituído do Mix [2,5µl de Tampão 1x + 1,5µl de MgCl₂ (3mM) + 0,5µl DNTP (200mM) + 2,5µl Primer (1mM) + 0,2µl Taq polimerase (1 U) + 15,8µl de água ultra pura para completar o volume], e 2µl de amostra do DNA diluído com água ultra pura na proporção 1:2 (v/v).

Tabela 1 - Iniciadores de RAPD e suas respectivas sequências no sentido 5' - 3'.

INICIADORES	SEQUÊNCIA 5' → 3'
MEP – 01	AGACGGCTCC
MEP – 02	GTTACGGACC
MEP – 03	GGGCGACTAC
MEP – 04	GTGCGCAATG
MEP – 05	TCGCATCCAG
MEP – 06	CAGAAGCGGA
MEP – 07	CACAGCGACA
MEP – 08	CAAAGCGCTC
MEP – 09	TCCCCATCAC
MEP – 10	TGCGGGTCCT
MEP – 11	CAGGATTCCC
MEP – 12	GTGGAGTCAG
MEP – 13	AAGTCCGCTC
MEP – 14	CAGCACTGAC

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador programado para uma desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos com a sequência de 15” a 94°C, 30” a 40°C e 60” a 72°C, ao final dos 40 ciclos, foi feita a extensão final a 72°C por 7 minutos.

Após a realização da amplificação o produto final foi submetido a eletroforese, onde foi utilizado 3µl do tampão azul de bromofenol, e 10µl do produto da reação de PCR. As amostras de bandas amplificadas no gel foram fotografadas em luz UV por um fotodocumentador, e foi estimada por comparação visual da intensidade de fluorescência das bandas do DNA, com a do padrão conhecido do Ladder 1 Kb (Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA).

4.5 Diversidade genética

Para estimar a diversidade genética entre os acessos, primeiramente foi necessário a construção de uma matriz binária, feita a partir do perfil eletroforético dos géis de cada primer, a comparação foi feita por um padrão do Ladder 1 Kb (Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA), onde “0” significa ausência, e “1” a presença de banda. Foi definido como loco polimórfico aquele em que a frequência do alelo mais comum foi igual ou inferior a 0,95. As distâncias genéticas entre pares de indivíduos (dissimilaridade) foram estimadas por meio do programa Genes (CRUZ, 2006) usando a distância binária de Sokal (1962). A partir da matriz de dissimilaridade foi gerado o dendrograma usando o método de agrupamento de Ward.D2 (1963). Para o corte no

dendrograma, foi adotado o critério proposto por Mojena (1977), o qual se baseia no tamanho relativo dos níveis de fusões (distâncias) no dendrograma. Os acessos também foram agrupados um o método de otimização de Tocher (RAO, 1952) a partir da matriz de dissimilaridade.

5. Resultados e discussão

O protocolo de extração de DNA proposto por Doyle E Doyle foi eficiente quanto utilizado tecidos de raiz, apenas quatro acessos (PU-2, PU-4, PU-12 e PU-17) não apresentaram DNA.

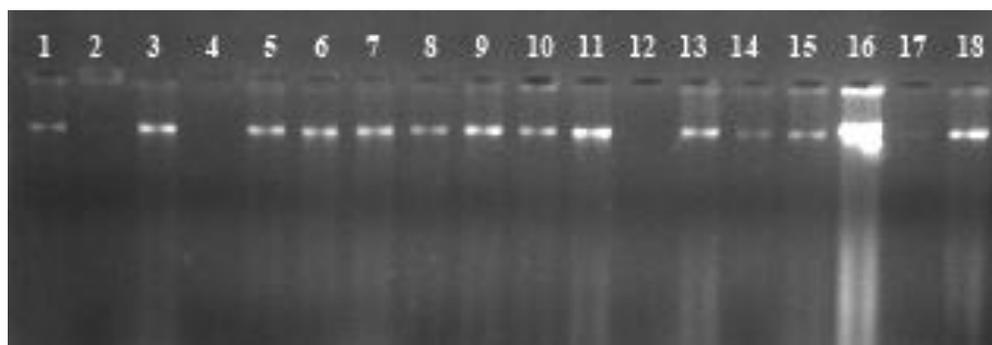


Figura 3- Perfil eletroforético de DNA genômico em gel de agarose dos 18 indivíduos de *P. Umbraticola* a partir de raízes. Somente os acessos 2, 4, 12 e 17 não foi possível extrair o DNA, neste ensaio.

As reações de PCR com os 14 marcadores RAPD gerou um total de 169 bandas amplificadas, com 44 locus polimórficos, e nenhum loco monomórfico, mostrando assim que os indivíduos analisados são 100% polimórficos e que os mesmos possuem grande diversidade genética. Os iniciadores mais polimórficos foram MEP 01, MEP 02, MEP 03, MEP 05 e MEP 06, os quais amplificaram um maior número de bandas, respectivamente 18, 20, 17, 18 e 50 bandas (Figura 5), enquanto os MEP 04, MEP 07, MEP 08, MEP 10, MEP 12, MEP 13 E MEP 14, apresentaram menores ampliações, sendo as seguintes 7, 13, 13, 2, 4, 6 e 1 bandas, e para o MEP 9 e MEP 11, não houve ampliações (Tabela 2).

Alam, et al. (2015) ao avaliar a diversidade genética de *Portulaca oleracea* usando marcador ISSR identificou um alto grau de polimorfismo nos indivíduos estudados, ou seja, 97,6% de locus polimórficos, o que indica que tanto o marcador RAPD quanto o ISSR são eficazes para avaliar a diversidade genética do gênero *Portulaca*.

A diversidade genética encontrada no gênero *Portulaca* deve-se a fertilização cruzada realizada por inúmeros insetos e abelhas nativas, que são atraídas por suas flores delicadas, pequenas e coloridas (MAIA-SILVA, 2012).

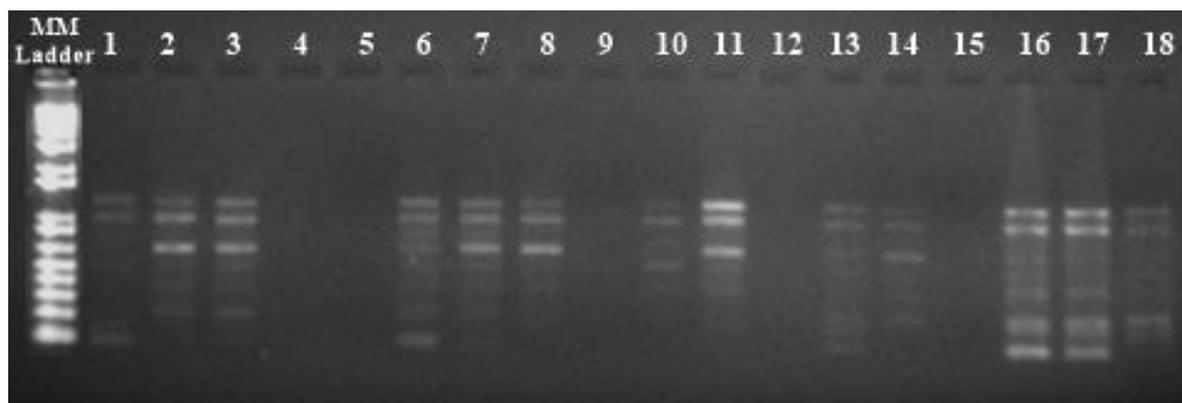


Figura 4. Produtos de amplificação de RAPD gerados com o iniciador MEP 06 em 18 indivíduos de *P. umbraticola*.

Tabela 2 - Iniciadores RAPD, número de bandas amplificadas, locus polimórficos e monomórficos e de polimorfismo em indivíduos da espécie *Portulaca umbraticola*.

Iniciadores	Nº de bandas amplificadas	Nº de locus polimórficos	Nº de locus monomórficos	Polimorfismo (%)
MEP 01	18	3	0	100
MEP 02	20	5	0	100
MEP 03	17	4	0	100
MEP 04	7	3	0	100
MEP 05	18	4	0	100
MEP 06	50	8	0	100
MEP 07	13	3	0	100
MEP 08	13	5	0	100
MEP 09	0	0	0	0
MEP 10	2	1	0	100
MEP 11	0	0	0	0
MEP 12	4	3	0	100
MEP 13	6	4	0	100
MEP 14	1	1	0	100

Os valores da matriz de dissimilaridade obtidos a partir da distância binária de Sokal encontram-se na tabela 3. A partir dessas distâncias entre os 18 acessos foi construído o dendrograma usando a metodologia proposta por Ward.d2. Ao analisar as distâncias genéticas (dissimilaridade) entre os 18 acessos de *P. umbraticola* foi encontrado um índice de 0,7671, entre os indivíduos 12 e 16, sendo estes os mais dissimilares, e sugeridos como genitores, pois para a realização de cruzamentos e seleção deve-se indicar aqueles indivíduos que possuam maior divergência ou distância genética, pois assim, aumenta a probabilidade de se obter uma população divergente, com alto grau de variabilidade. Também é indicado que seja feita a coleta

de sementes desses acessos geneticamente distantes para armazenamento em banco de germoplasma, preservando assim maior diversidade genética.

A variabilidade genética presente entre indivíduos da mesma espécie é crucial para programas de conservação e melhoramento, pois, se não houver variabilidade e interação com o ambiente, torna-se consideravelmente impossível obter genótipos diversificados através de melhoramento genético (BARBOSA-NETO E BERED, 1998), sendo assim, é primordial que se conheça a diversidade genética que há entre eles (Mendes, 2014). Segundo Mendes (2014), espécies que não apresentam diversidade genética suficiente, podem não ser capazes de responder a mudanças ambientais, competir com outras plantas, ou até mesmo ter uma defesa bem-sucedida contra pragas e predadores.

Tabela 3. Matriz de dissimilaridades genéticas entre 18 indivíduos de *P. umbraticola* usando a distância binária de Sokal.

Acessos	PU-01	PU-02	PU-03	PU-04	PU-05	PU-06	PU-07	PU-08	PU-09	PU-10	PU-11	PU-12	PU-13	PU-14	PU-15	PU-16	PU-17	PU-18
PU - 01	0,0000																	
PU - 02	0,4423	0,0000																
PU - 03	0,5710	0,4663	0,0000															
PU - 04	0,4423	0,5108	0,6255	0,0000														
PU - 05	0,4170	0,4890	0,6427	0,2554	0,0000													
PU - 06	0,5898	0,5316	0,5710	0,5710	0,5898	0,0000												
PU - 07	0,4890	0,4170	0,4170	0,4663	0,4890	0,4890	0,0000											
PU - 08	0,4663	0,4890	0,5710	0,3901	0,4170	0,5108	0,3901	0,0000										
PU - 09	0,4423	0,5108	0,6255	0,2085	0,1474	0,5710	0,4663	0,3901	0,0000									
PU - 10	0,4890	0,4663	0,5108	0,5517	0,4890	0,6079	0,5108	0,5710	0,5108	0,0000								
PU - 11	0,5108	0,4423	0,5710	0,5316	0,5517	0,5898	0,5316	0,5108	0,5710	0,5316	0,0000							
PU - 12	0,5108	0,5316	0,6079	0,3297	0,3612	0,5898	0,4423	0,4170	0,3297	0,5316	0,5108	0,0000						
PU - 13	0,3297	0,4170	0,5898	0,3612	0,3297	0,6079	0,5108	0,4423	0,3612	0,4170	0,4423	0,4890	0,0000					
PU - 14	0,4663	0,4890	0,6079	0,4423	0,3612	0,5517	0,4423	0,4170	0,3901	0,4890	0,5517	0,5108	0,3901	0,0000				
PU - 15	0,4170	0,4890	0,6427	0,2554	0,0000	0,5898	0,4890	0,4170	0,1474	0,4890	0,5517	0,3612	0,3297	0,3612	0,0000			
PU - 16	0,6757	0,6255	0,5517	0,7223	0,7372	0,6757	0,6916	0,7071	0,7518	0,6594	0,6079	0,7661	0,6594	0,6757	0,7372	0,0000		
PU - 17	0,6255	0,6427	0,6427	0,6757	0,6594	0,7223	0,7071	0,7223	0,6757	0,5710	0,6916	0,7223	0,5710	0,6255	0,6594	0,4890	0,0000	
PU - 18	0,4423	0,4663	0,6255	0,4170	0,3297	0,6079	0,5108	0,4423	0,3612	0,5108	0,5710	0,4890	0,3612	0,3297	0,3297	0,7223	0,6427	0,0000

A análise de agrupamento feita a partir do método Ward.d2 tendo como base a distância genética binária de Sokal, possibilitou a formação de 3 grupos para os 18 indivíduos de *P. umbraticola*, sendo o ponto de corte (1,164) realizado segundo os critérios propostos por Mojena (1977).

O grupo I incluiu 13 dos 18 acessos: 1 (PU-01), 2 (PU-02), 3 (PU-03), 6 (PU-06), 7 (PU-07), 8 (PU-08), 10 (PU-10), 11 (PU-11), 13 (PU-13), 14 (PU-14), 16 (PU-16), 17 (PU-17) e 18 (PU-18). O grupo II englobou 3 acessos, o 4 (PU-04), 9 (PU-09) e 12 (PU-12), o grupo III englobou 2 acessos, o 5 (PU-05) e o 15 (PU-15). O grupo I incluiu 72,22% do total de indivíduos, mas, apesar de serem mais similares, ainda possuem grande diversidade genética entre eles.

Com base no dendrograma é possível sugerir para genitores os acessos 14 e 15, para cruzamentos entre os acessos mais dissimilares geneticamente, e produzir populações segregantes. Heiden (2006) destaca a importância de se investir em plantas nativas com potencial ornamental, uma vez que sua disponibilização para a comercialização representam um diferencial em um mercado altamente competitivo.

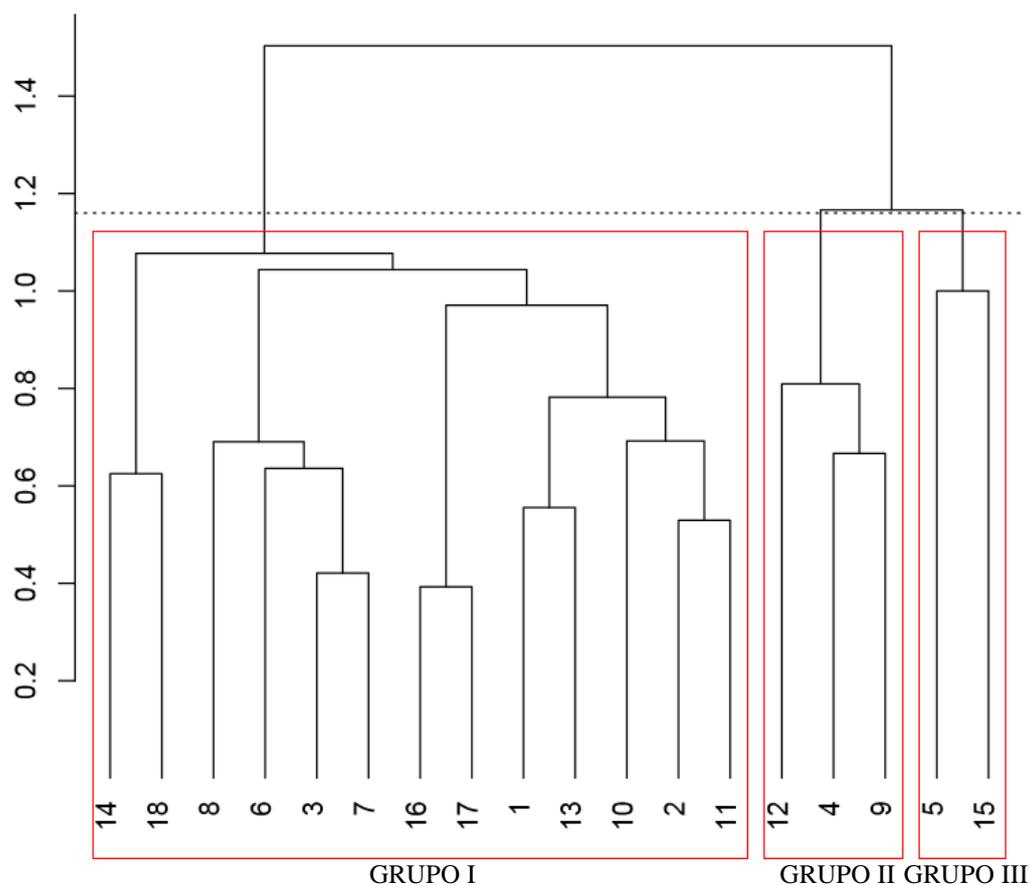


Figura 5. Dendrograma construído por meio do método WARD. D2, com base na matriz de dissimilaridade genética entre indivíduos de *P. umbraticola* a partir de 14 iniciadores RAPD.

Na tabela 4 pode-se observar que o agrupamento pelo método de otimização de Tocher (1952), a partir da matriz de dissimilaridade permitiu a formação de 6 grupos distintos, este método agrupa os indivíduos com base no critério de que as distâncias dentro do grupo sejam menores que entre os grupos (CRUZ & REGAZZI, 2001). Sendo assim, este agrupamento é uma valiosa informação para se escolher genitores distantes para formação de novas cultivares. O grupo I, também inclui o maior número de acessos, 12 dos 18 acessos (1, 2, 4, 5, 8, 9, 12, 13, 14, 15 e 18), enquanto que o grupo II reuniu apenas os acessos 16 e 17. Os grupos III, IV, V e VI, foram constituídos de um único acesso, respectivamente, 3, 10, 11 e 6.

Tabela 4. Agrupamento dos 18 acessos de *P. Umbraticola* baseado no método de otimização de Tocher.

Grupo	Acessos
I	5, 15, 9, 4, 12, 13, 18, 14, 8, 1, 7, 2
II	16,17
III	3
IV	10
V	11
VI	6

O coeficiente de correlação cofenética (CCC) (Tabela 5) obtido a partir da matriz de dissimilaridade e a matriz de agrupamento, obteve um número significativo ($r=86\%$) evidenciando desta forma a consistência da integridade dos agrupamentos formados. Vaz Patto et al. (2004) afirmam que quando o $r>0,56$ ele é considerado ideal e, conseqüentemente, indica haver uma ótima concordância entre a matriz de dissimilaridade e a de agrupamento.

Tabela 5. Correlação cofenética baseado nos dados moleculares (RAPD) avaliados de 18 acessos.

Estatística	Valor
Correlação cofenética (CCC)	0.8606
Graus de liberdade	151
Valor de t	20.7689
Probabilidade	0.0**

6. Conclusão

O marcador RAPD foi eficiente em avaliar a diversidade genética na população de *Portulaca umbraticola*, permitindo discriminar os acessos, e evidenciando que há variabilidade genética.

Os acessos 12 e 16, podem ser sugeridos como potenciais genitores em um programa de melhoramento da espécie, por serem os mais distantes geneticamente.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. Amirul et al. Genetic diversity analysis among collected purslane (*Portulaca oleracea* L.) accessions using ISSR markers. **Comptes rendus biologiques**, v. 338, n. 1, p. 1-11, 2015.
- ANASTASSOPOULOS, E.; KEIL, M. Assessment of natural and induced genetic variation in *Alstroemeria* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica*, v.90, p.235-244, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF00023864>>. Acesso em: 20 jan. 2005. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.
- APPLEQUIST, W.L. & WALLACE, R.S. 2001. Phylogeny of the Portulacaceous Cohort Based on ndhF Sequence Data. **Systematic Botany** 26(2): 406-419.
- BARBOSA NETO, J. F.; BERED, F. Marcadores moleculares e diversidade genética no melhoramento de plantas. In: MILACH, S. C. K. Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre: Ed. UFRGS,1998. p. 29-40.
- BERNET, G.P. et al. Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. *Plant Breeding*, v.122, p.146-152, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00838.x>>. Acesso em 17 jun. 2009. doi: 10.1046/j.1439-0523.2003.00838.x.
- BOLARIC, S. et al. Molecular genetic diversity within and among German ecotypes in comparison to European perennial ryegrass cultivars. *Plant Breeding*, v.124, p.257-262, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0523.2005.01108.x>>. Acesso em 09 de junho de 2019. doi: 10.1111/j.14390523.2005.01108.x.
- BORÉM, A. Melhoramento de plantas. 2 ed. Viçosa: UFV, 1997.
- BRAMMER, Sandra Patussi. Variabilidade e diversidade genética vegetal: requisito fundamental em um programa de melhoramento. **Embrapa Trigo-Documentos** (INFOTECA-E), 2002.
- BRASIL. (2015). LEI Nº 13.123, DE 20 DE MAIO DE 2015. Convenção sobre Diversidade Biológica.
- CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.). Marcadores moleculares. Viçosa: UFV, 2006. p. 9-78
- CAROLIN, R.C. 1993. Portulacaceae. Pp. 544-555. In: K. Kubitzki, J.B. Rhower & V. Bittrich (eds.) **The Families and Genera of Vascular Plants. Flowering Plants –Dicotyledons** (2), Berlin, Ed. Springer Verlag.
- CHIARI, L.; DO VALLE, J. V. R.; RESENDE, R. M. S. Comparação de três métodos de extração de DNA genômico para análises moleculares em *Stylosanthes guianensis*. **Embrapa Gado de Corte-Circular Técnica** (INFOTECA-E), 2009.

COELHO, Alexa Araujo de Oliveira Paes; GIULIETTI, Ana Maria. The genus *Portulaca L.* (Portulacaceae) in Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 3, p. 655-670, 2010.

CRUZ, C. D. Programa genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2006, 648 p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. UFV, 2001. 390p.

DA MATA, T.L. et al. Genetic divergence among gerbera accessions evaluated by RAPD. *Scientia Horticulturae*, v.121, p.92-96, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2009.01.026>>. Acesso em 09 de junho de 2019. doi: 10.1016/j.scienta.2009.01.026.

DE JUSSIEU, Antoine-Laurent. **Genera plantarum secundum ordines naturales disposita juxta methodum in horto regio parisiensi exaratam, anno 1774.** veuve Herissant, 1789.

DOYLE, J.J. AND DOYLE, J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.

EGGLI, U. & FORD-WERNTZ, D. 2002. **Illustrated Handbook of Succulent Plants-Dicotyledons.** Portulacaceae. Pp. 370-432. New York, Ed. Springer.

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

FILLIETTAZ, Andrea. MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS ORNAMENTAIS. *Biológico*, São Paulo, v.69, n.2, p.95, 2007.

FRANCA, Carlos Alberto Machado De; MAIA, Moacyr Boris Rodrigues. **Panorama do agronegócio de flores e plantas ornamentais no Brasil.** 2008.

GEESINK, R. An account of the genus *Portulaca* in Indo-Australia. **Blumea**, v. 17, n. 2, p. 276, 1969.

HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: SCHNEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBRIDE, B.;

HEIDEN, Gustavo; BARBIERI, Rosa Lía; STUMPF, Elisabeth Regina Tempel. Considerações sobre o uso de plantas ornamentais nativas. **Ornamental Horticulture**, v. 12, n. 1, 2006.

JUNQUEIRA, ANTONIO HÉLIO; PEETZ, M. da S. O setor produtivo de flores e plantas ornamentais do Brasil, no período de 2008 a 2013: atualizações, balanços e perspectivas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 20, n. 2, p. 115-120, 2014.

KUNTH, C.S.; Von Humboldt, F.A. & Bonpland, A. 1823. **Nova Genera et Species Plantarum.** p. 70-75.

LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2000.

LEGRAND, C. Diego. **Las especies americanas de Portulaca**. Museo de historia natural, 1962.

MACHADO FILHO, H. O. et al. Composition and similarity of flora associated with anthropogenic sites in the city of João Pessoa-Paraíba. **Planta Daninha**, v. 33, n. 1, p. 57-66, 2015.

MAIA-SILVA, Camila et al. Guia de plantas: visitadas por abelhas na Caatinga. 2012.

MENDES, R. F. M.; ARAUJO NETO, R. B.; NASCIMENTO, M. P. S. B. C.; LIMA, P. S. C. RAPD analysis of the genetic diversity among accessions of Fabaceous forages (*Poincianella* spp.) from the Caatinga. *Genetics and Molecular Research*, v. 13, n. 3, p. 5832-5839, 2014.

MOJENA, R. Hierarquial grouping methods and stopping rules: an evaluation. *The Computer Journal*, v. 20, n. 4, p. 359-363, 1977.

NEPOMUCENO, Alcebíades Renato. Diversidade genética de populações naturais e de cultivo do bijupirá (*Rachycentroncanadum*) no Brasil. 2017.

NUNES, OTÁVIO. IAC melhora geneticamente cinco plantas ornamentais. *Diário Oficial*, São Paulo, 126 (63), 6 de abril de 2016.

NYFFELER, Reto; EGGLI, Urs. Disintegrating Portulacaceae: a new familial classification of the suborder Portulacineae (Caryophyllales) based on molecular and morphological data. **Taxon**, v. 59, n. 1, p. 227-240, 2010.

PETIT, R. J.; MOUSADIK, A.; PONS, A. O. Identifying Populations for Conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*. Gainesville, v. 12, n. 4, p. 844-855, 1998.

RAO, C.R. Advanced statistical methods in biometric research. New York: John Wiley and Sons, 1952. 389p.

REIS, A. M. M.; GRATAPAGLIA, D. RAPD variation in a germoplasm collection of RITLAND, K. Inferring the genetic basis of inbreeding depression in plants. *Genome*, v. 39, n. 1, p. 1-8, 1996.

RODRIGUES, M. I. A.; FURLAN, A. Portulacaceae. In: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPBEAL, G. J.; GIULIETTI, A. M. (Ed.). **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo**. v. 2. São Paulo: Hucitec, 2002. p. 261-268.

SANTOS, Fabrício R. et al. Diversidade genética. **Biota Minas: Diagnóstico do conhecimento da diversidade genética**. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, p. 390-410, 2009.

SILVA, B. L. R.; TAVARES, Fernanda Meira; CORTEZ, Jarcilene S. Almeida. Composição florística do componente herbáceo de uma área de caatinga-Fazenda Tamanduá, Paraíba, Brasil. **Revista de Geografia** (UFPE), v. 29, n. 3, 2012.

SIVIERO, Amauri et al. Plantas ornamentais em quintais urbanos de Rio Branco, Brasil. **Embrapa Acre-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2014.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon*, Berlin, v.11, n.1, p.30-40, 1962.

TELES, Simone et al. *Plantas espontâneas: identificação, potencialidade e uso*. 2013.

TOMBOLATO, Antonio FC et al. Domesticação e pré-melhoramento de plantas: I. Ornamentais. *O Agrônomo*, Campinas, v. 56, n. 1, p. 12-14, 2004.

TORRES, A.M. et al. Identifying rose cultivars using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *HortScience*, n.28

VAZ PATTO, M.C. et al. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. *Euphytica*, v.137, p.63-67, 2004.

VELASCO-RAMÍREZ, A. P.; TORRES-MORÁN, M. I.; MOLINA-MORET, S.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, J. J.; SANTACRUZ-RUVALCABA, F. Efficiency of RAPD, ISSR, AFLP and ISTR markers for the detection of polymorphisms and genetic relationships in camote de cerro (*Dioscorea* spp.). *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 17, n. 2, p. 65-71, 2014.

WARD, J.H. (1963), "Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function", *Journal of the American Statistical Association*, 58, 236-244.

WILLIS, J. C. 1966. **A dictionary of flowering plants and ferns**. 7^a ed. Cambridge, University Press.

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

WOLFF, K.; PETERS-VAN RIJN, J. Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) using random primers. *Heredity*, v.71, p.335-341, 1993. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/hdy.1993.147>>. Acesso em 09 de junho de 2019. doi: 10.1038/hdy.1993.147.

YAMAGISHI, M. Detection of section-specific random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Lilium*. *Theoretical and Applied Genetics*, v.91, p.830-835, 1995. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF00223888>>. Acesso em 09 de junho de 2019. doi: 10.1007/BF00223888.