A large, mature tree with a dense canopy of green, elongated leaves. Numerous clusters of small, bright yellow flowers are visible, hanging from the branches. The tree is situated in an outdoor area with a paved path and a white fence visible in the background under a clear sky.

Milene Sampaio Clemente

**Análise da variação genética de
populações de *Vochysia pyramidalis* e
V. tucanorum por AFLP e da
composição de ácidos graxos de
sementes**

**São Paulo
2010**

Vochysia pyramidalis

Milene Sampaio Clemente

**Análise da variação genética de
populações de *Vochysia pyramidalis* e
V. tucanorum por AFLP e da
composição de ácidos graxos de
sementes**

Orientador: Prof^a Dr^a Maria Luiza Faria Salatino

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Ciências, na área de
Botânica.

São Paulo
2010

Clemente, Milene Sampaio

Análise da variação genética de populações de *Vochysia pyramidalis* e *V. tucanorum* por AFLP e da composição de ácidos graxos de sementes.

Número de páginas: 105

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica, 2010.

1.Vochysiaceae 2.Ácidos graxos 3.Fragmentos de restrição (AFLP) 4.*Vochysia pyramidalis* 5.*Vochysia tucanorum*. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof (a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a)

Prof(a). Dr(a).

Profª Drª Maria Luiza Faria Salatino
(Orientadora)

Dedico este trabalho a toda a minha família e ao meu namorado Fábio por toda a paciência, apoio, e por todos os momentos em que me ausentei, não só física, mas também mentalmente, para conseguir concluir este projeto de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por permitir que eu realizasse esse sonho, desenvolver um projeto de pesquisa.

Em seguida agradeço imensamente à minha família, principalmente a meus pais que me apoiaram sempre tanto financeira quanto emocionalmente nos momentos mais difíceis desta aventura, e ao meu namorado Fábio que durante o último ano foi muito importante para o meu equilíbrio emocional durante fases muito difíceis do projeto.

Agradeço imensamente a minha orientadora Prof^a Dr^a Maria Luiza Faria Salatino e ao Prof. Dr. Antonio Salatino por todo o carinho, atenção, e por acreditar em mim para a realização deste projeto. Nunca vou conseguir agradecer o suficiente, muito obrigada.

À técnica Mourisa que muito me ajudou, principalmente no início de tudo isso. Acredite, você é fundamental neste laboratório.

Ao Vítor, meu companheiro nas análises de laboratório, muito obrigada por toda a ajuda, valeu mesmo!

A todos os amigos do laboratório, Adne, Carol, Bruno, Anary, Janaína, Joyce, Carmem, Vanessa, Alice, Liss. Enfim, a todos do laboratório que me ajudaram muito, não só profissionalmente, mas também emocionalmente, nas brincadeiras, nos cafés, nos desabafos, nos momentos de desespero, de angústia, ou seja, vocês são fantásticos. Caso tenha esquecido o nome de alguém me perdoem, foi sem querer, agradeço a todos.

Á todo o pessoal do IBGE de Brasília pela simpatia e ajuda durante minhas coletas principalmente à Marina pela sua atenção.

Ao Prof. Dr. Manoel Cláudio da Silva Junior, da UnB, que tanto me ajudou durante as primeiras coletas em Brasília e no IBGE.

A todo o pessoal do IBAMA-Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, principalmente ao Daniel e a Simone que me receberam tão bem.

À Prof^a. Dr^a. Anne Ligia Dokkedal, da UNESP de Bauru e as suas alunas Fernanda e Denise por toda a ajuda durante a coleta de Bauru.

À Dr^a. Cristiane Del Nero Rodrigues que tanto me ajudou nas coletas das populações de Botucatu, Sengés e de todas as de *Vochysia pyramidalis*. Cris, muito obrigada por tudo, por todas as vezes que você cedeu sua casa quando eu precisei, por todos os ensinamentos no laboratório e por todo o carinho.

À Prof^a. Dr^a. Gladys Flávia de A. Mello de Pina e todos os seus alunos da Anatomia Vegetal que participaram de uma grande viagem de coleta e que muito me ajudaram.

Ao Prof. Dr. Gregório C. T. Ceccantini por todas as sugestões de pontos de coleta.

À Prof^a. Dr^a. Kikyo Yamamoto, da UNICAMP, pela identificação dos indivíduos coletados.

À Prof^a. Dr^a Cláudia Maria Furlan, à Prof^a. Dr^a Déborah Y.A.C. dos Santos e a Dr^a Lucimar Barbosa da Motta pelas sugestões e auxílio em várias etapas deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado e à FAPESP pelo financiamento do projeto.

ÍNDICE

1. Introdução.....	01
1.1. Vochysiaceae.....	01
1.1.1. Distribuição geográfica de <i>Vochysia pyramidalis</i> e <i>Vochysia tucanorum</i>	02
1.2. Ácidos graxos de sementes e sua importância em Vochysiaceae.....	05
1.3. Genética e marcadores moleculares.....	08
1.3.1. Importância da técnica AFLP.....	09
1.3.2. AFLP caracteriza-se por quatro etapas.....	12
1.3.3. Vantagens na utilização da técnica AFLP.....	14
1.3.4. Limitações da técnica AFLP.....	15
2. Objetivos.....	19
3. Material e métodos.....	19
3.1. Preparo do material botânico.....	19
3.2. Metodologia.....	22
3.2.1. Extração dos óleos das sementes e derivação de seus ácidos graxos.....	22
3.2.2. Identificação dos ácidos graxos.....	23
3.2.3. AFLP.....	24
3.2.3.1. Extração e quantificação do DNA.....	24
3.2.3.2. Reação de restrição (digestão).....	25
3.2.3.3. Reação de Ligação.....	26
3.2.3.4. Reação de amplificação pré-seletiva.....	26
3.2.3.5. Reação de amplificação seletiva.....	26
4. Resultados e discussão.....	28
4.1. Óleos fixos de sementes.....	28
4.2. AFLP.....	33
5. Tabelas e figuras.....	40
6. Resumo.....	78
7. Abstract.....	80
8. Anexos.....	82
9. Referências Bibliográficas.....	87

1. INTRODUÇÃO

1.1. Vochysiaceae

As Vochysiaceae possuem distribuição neotropical, com exceção de *Erismadelphus* e *Korupodendron*, nativos da África Ocidental. A família inclui oito gêneros e cerca de 250 espécies, com mais da metade em *Vochysia* (latinização de vochy, nome popular de uma das espécies nas Guianas; Da Silva Junior, M.C., 2005), um dos gêneros nativos da nossa flora. No Brasil ocorrem seis gêneros e aproximadamente 150 espécies. É uma das principais famílias do cerrado, nos quais se destacam espécies de *Qualea*, conhecidas popularmente por pau-terra, *Vochysia* (pau-de-tucano, cambará), *Callisthene* (itapicuru, pau-de-pilão), além de *Salvertia convallariodora* (colher-de-vaqueiro). Na Amazônia, espécies de Vochysiaceae são relativamente comuns, correspondendo a grandes árvores com sapopemas, estando representados aí quase todos os gêneros, inclusive *Euphronia* e *Ruizterania*. Nessa região é relativamente comum a quarubarana (*Erism uncinatum*). *Callisthene*, *Erisma*, *Euphronia*, *Qualea*, *Ruizterania*, *Salvertia* e *Vochysia* são gêneros nativos da nossa flora. A partir dos recentes trabalhos em filogenia, o gênero *Euphronia*, tradicionalmente reconhecido entre as Trigoniaceae ou entre as Vochysiaceae, deveria ser segregado em uma família à parte, Euphroniaceae, pertencente à ordem Malpighiales (Souza & Lorenzi, 2005; Souza & Lorenzi, 2008).

Figura 1. Mapa de distribuição de Vochysiaceae (de acordo com APG II, 2003)

Vochysiaceae apresenta hábito arbóreo ou arbustivo, raramente subarbustivo. As folhas são simples, opostas ou verticiladas; as inflorescências cimosas ou racemosas, às vezes reduzida a uma única flor ou paniculada; as flores são geralmente vistosas, bissexuadas, zigomorfas; o ovário é tricarpelar e trilocular ou unicarpelar; o fruto, uma cápsula loculicida ou sâmara (Souza & Lorenzi, 2005; Souza & Lorenzi, 2008).

Tradicionalmente, Vochysiaceae foi associada por Cronquist (1981) às Polygalales, ligada a famílias como Malpighiaceae, Tremandraceae e Krameriaceae, enquanto Takhtajan (1997) a colocou em Vochysiales. A filogenia molecular, baseada na região *rbcL* do cloroplasto, entretanto, evidenciou sua relação com as Myrtales (APG III, 2009).

As Vochysiaceae têm alto potencial oleaginoso. Sementes de *Vochysia pyramidalis* e *V. tucanorum* têm um teor de óleo de 28,56% e 27,25%, respectivamente (Mayworm *et al.*, 2010).

Espécies da família, principalmente *Vochysia tucanorum*, vêm sendo utilizadas na medicina popular, principalmente na região Central do país, na prevenção e tratamento de lesões da mucosa gástrica, comumente usada na forma de chás feitos a partir de suas folhas. Gomes *et al.* (2009) confirmaram essa utilização testando extratos metanólicos e butanólicos de *Vochysia tucanorum* em ratos. Investigações fitoquímicas da fração butanólica identificaram diferentes triterpenóides pentacíclicos como ácido betulínico, eritrodiol, ácido epi-betulínico, e derivados do ácido ursólico e ácido oleanólico, os quais provavelmente conferem a essa planta medicinal a potente ação gastroprotetora. Outros autores (Hess *et al.*, 1995; Hess & Delle Monache, 1999; ; Zucaro *et al.*, 2000; Calderón *et al.*, 2001; Weniger *et al.*, 2005; Gaspi, *et al.*, 2006; Hiruma-Lima *et al.*, 2006) já haviam detectado na casca do caule de algumas espécies de *Vochysia*, terpenóides (ácidos betulínico, serícico e divergióico), esteróides (β-sitosterol), saponinas, componentes fenólicos e taninos que, acredita-se, sejam os responsáveis por seu efeito analgésico, por sua ação no sistema nervoso central, apresentando também propriedades anti-inflamatórias, anti-bacterianas e anticonvulsivantes.

1.1.1. Distribuição Geográfica de *Vochysia pyramidalis* e *Vochysia tucanorum*

Algumas das espécies brasileiras de *Vochysia* crescem em campos rupestres da Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais e campos de altitude da Bahia. Grão-Mogol (MG)

apresenta-se como elo de ligação entre essas duas formações, com paisagem predominantemente arbustiva (Mello-Silva, 1989).

Figura 2. A – Indivíduo de *Vochysia tucanorum* população de Sengés (PR), B – Indivíduo de *Vochysia pyramidalis* da população de Palmeiras (BA), C – Indivíduo em flor de *Vochysia tucanorum* da população do IBGE, D – Indivíduo em flor de *Vochysia pyramidalis* da população da UnB-Brasília (DF), E – Frutos de *Vochysia tucanorum* da população de Sengés (PR), F – Detalhe dos frutos de *Vochysia pyramidalis* da população da UnB-Brasília (DF), G – Frutos de *Vochysia tucanorum*, H – Sementes de *Vochysia tucanorum*, I – Fruto aberto com semente de *Vochysia pyramidalis*.

Vochysia pyramidalis apresenta hábito arbóreo, iniciando sua floração em setembro e frutificando entre dezembro e janeiro. É encontrada em matas de galerias, campos de altitude e cerrado. Distribui-se geograficamente nos estados do Ceará, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais (Passos & França, 2003) e nos campos de altitude da Bahia. Nestes últimos, pode, por exemplo, ser encontrada na Chapada Diamantina, em Abaíra, Andaraí, Ituaçu, Palmeiras, Lençóis, Rio de Contas, Mucugê, Serra do Açuruá e Catolés (de acordo com levantamento feito no Herbário do Departamento de Botânica – IBUSP).

Vochysia tucanorum, também uma espécie arbórea, floresce de novembro a março, frutifica entre agosto e setembro, apresentando uma ampla distribuição. Pode ser encontrada em campos rupestres da Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais e em campos de altitude da Bahia (acima de 400m), e no cerrado, sendo mais comum no cerrado. Essa espécie já foi coletada nos estados de Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo, além do Paraguai e Suriname. Planta pioneira, adaptada a terrenos arenosos e pobres podendo ser empregada em reflorestamentos heterogêneos destinados à recomposição de áreas de preservação permanente (Lorenzi, 1992; Passos & França, 2003; Durigan *et al.*, 2004).

Vochysiaceae é uma das principais famílias do cerrado. O bioma cerrado é provavelmente a maior savana do mundo, ocupando aproximadamente 2.000.000 Km² no Brasil central, além de áreas disjuntas nos outros biomas adjacentes. Infelizmente, restam intactos somente 356.630 Km², ou cerca de 20% do bioma original, comprometendo, portanto, muito da sua biodiversidade. Este fato, aliado a 1,1 % da sua área legalmente declarada como Área de Proteção Ambiental e 2,5% declarados como de preservação permanente, dá uma idéia dos riscos de perda de informações sobre a florística da região (Ribeiro *et al.*, 2001; Scariot *et al.*, 2005; Felfili *et al.*, 2007).

Essa vegetação é antiga. Parece ter existido vegetação savânica bastante semelhante a atual no Mioceno, 27 a 10 milhões a.C (evidências palinológicas). Evidências palinológicas e botânicas indicam que o clima e substrato são os fatores determinantes para o desenvolvimento dos cerrados e este se deu antes dos impactos antropogênicos. O evento de período seco em torno de 6 mil a.C., quando ocorreram significativas queimadas naturais, parece ter favorecido a expansão do cerrado no Brasil central, embora a influência

antropogênica por incêndios e desmatamento só foi observada em torno de 600 a.C. (Felfili *et al.*, 2007). O cerrado apresenta solo pobre de nutrientes e sofre uma ação intensa de queimadas. (Coutinho, 1978).

Além do cerrado, *Vochysia pyramidalis* e *Vochysia tucanorum* também são encontradas em matas ripárias, conhecidas também como matas de galeria ou matas ciliares, crescendo nas margens de córregos em áreas de cerrado, com predominância no centro-oeste brasileiro (Paula *et al.*, 2000). Pela própria natureza do ecossistema, as matas de galeria encontram-se em transição quanto ao solo e seus gradientes de umidade. Este último geralmente impõe o tipo de vegetação, indicando espécies adaptadas, tolerantes ou indiferentes a solos encharcados ou sujeitos a inundações temporárias (Ribeiro, 1998).

1.2. Ácidos graxos de sementes e sua importância em Vochysiaceae

Os óleos e gorduras vegetais têm sido utilizados pelo homem há mais de 4000 anos (Kabara, 1984), tanto como alimento quanto para outros fins, como iluminação, lubrificação, cosméticos, sabões e unguentos. Os lipídeos vegetais mais importantes economicamente são os de reserva das sementes, chamados de óleos fixos. São ésteres de ácidos graxos (C_{12} - C_{22}) e glicerol, formando os triglicerídeos.

Cerca de 95% dos ácidos graxos obtidos por hidrólise de triglicerídeos, são representados pelos ácidos láurico ($C_{12:0}$), mirístico ($C_{14:0}$), palmítico ($C_{16:0}$) e esteárico ($C_{18:0}$) (ácidos saturados), e pelos ácidos oleico ($C_{18:1}$), linoleico ($C_{18:2}$), α -linolênico ($C_{18:3}$), todos insaturados com 18 átomos de carbono, e erúico ($C_{22:1}$), insaturado com 22 átomos de carbono (Miguel & Browse, 1995; Silva, 1998; Simões *et al.*, 2004). O ácido oleico e linoleico são predominantes nos óleos comestíveis mais consumidos, como os óleos de soja, amendoim, girassol, canola e oliva (White, 1992). Óleos ricos em ácidos graxos saturados são muito utilizados nas indústrias de cosméticos, produtos alimentícios e oleoquímicos (Berger, 1986; Graille, 1993; Davies & Flider, 1994).

Entre as gorduras vegetais, merece destaque a manteiga de cacau, extraída de sementes de *Theobroma cacao* L. (Sterculiaceae), largamente usada na indústria alimentícia e farmacêutica, principalmente na fabricação de chocolate, supositórios e batons (Banerji *et al.*, 1984; White, 1992).

Em *Vochysia*, predominam os ácidos graxos de cadeias médias e longas (C_{18} , C_{20} , C_{22}). Seis amostras de *V. pyramidalis* analisadas mostraram potencial utilização de suas sementes como substituto da manteiga de cacau, por apresentarem elevados teores de ácido oleico (37-57%) e esteárico (26-43%), além de ácido palmítico e ácido eicosanoico na composição de seu óleo (Mayworm, 1999). Uma das amostras apresentou um teor mais elevado de ácido esteárico em relação ao de ácido oleico. Tais resultados sugerem que uma seleção de genótipos nas populações da espécie pode levar à obtenção de linhagens com óleos dotados de propriedades muito semelhantes à manteiga de cacau. Entretanto, *Vochysia tucanorum*, apesar de pertencer à mesma seção, *Ciliantha*, apresenta uma constituição diferente de ácidos graxos, com quantidades expressivas de ácidos eicosenoico ($C_{20:1}$), beenico ($C_{22:0}$) e docosenoico (ácido erúico, $C_{22:1}$). Estudando a composição de ácidos graxos de espécies de Vochysiaceae, Mayworm & Salatino (2002) analisaram sua distribuição e verificaram que quantidades relativamente altas de C_{20} - C_{22} (saturado ou monoinsaturado) ou de ácido esteárico caracterizaram *Salvertia* e *Vochysia*, confirmando os resultados da pesquisa anterior.

Nos últimos anos, tem surgido um interesse em fontes renováveis para produtos industriais como parte de um esforço para promover a “química verde”, que busca a produção de materiais industriais em bases sustentáveis (Piazza & Foglia, 2001). Atualmente, o uso da biomassa como fonte renovável de energia, ajuda na reciclagem do dióxido de carbono atmosférico e não contribui para o efeito estufa (Haykiri-Açma, 2003).

Os óleos e gorduras são as matérias-primas mais importantes da indústria química. Cerca de 80% da produção global de óleos e gorduras são óleos vegetais e apenas 20%, com tendência ao declínio, são de origem animal. Cerca de 1/4 da produção global vem da soja, seguido pelo óleo de palma, colza (“rapeseed”) e girassol (Metzger & Bornscheuer, 2006).

A colza (*Brassica napus*) é a terceira mais importante fonte de óleo vegetal no mundo. O termo “rapeseed” tradicionalmente se refere a qualquer variedade que produza óleo com conteúdo de ácido erúico (ácido 13- cis docosenóico) em torno de 45% (Piazza & Foglia, 2001).

O óleo de canola que possui baixas quantidades de ácido erúico e glicosinolatos (Piazza & Foglia, 2001), é obtido de sementes modificadas de *Brassica napus* e *Brassica rapa*.

As sementes de canola contêm 41-48% de óleo, com nível muito baixo de ácidos graxos saturados (6%), altos níveis de ácido oleico (60%), cerca de 20% de ácido linoleico e 10% de ácido linolênico. Devido ao alto teor de óleo e numerosas vantagens agrícolas, a semente de canola está chamando a atenção do mundo (Jenab *et al.*, 2006).

O ácido erúcico fornece ácido beênico por hidrogenação catalítica. Os dois ácidos são utilizados como aditivos plásticos e detergentes, além de produtos de uso pessoal, cosméticos, tensoativos e têxteis (Piazza & Foglia, 2001). O ácido erúcico tem outras interessantes aplicações industriais, tais como fluido de isolamento para transformadores, e aditivo de asfalto para melhorar a propriedade de superfície (Metzger & Bornscheuer, 2006).

O diesel tem um importante papel na economia atual, sendo fundamental para o setor de transportes, necessitando de uma nova alternativa que seja tecnicamente viável, economicamente competitiva, ambientalmente aceitável e prontamente disponível. O biodiesel é produzido por transesterificação de óleos e gorduras provenientes de plantas e animais, ou seja, pela reação do óleo com álcool -geralmente metanol- produzindo ésteres metílicos, na presença de catalisadores ácidos ou básicos. O biodiesel é uma alternativa biodegradável, atóxica e que não contribui para a elevação dos níveis de CO₂ atmosféricos. No processo de transesterificação há a liberação de glicerol que é amplamente utilizado nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e de plásticos. Uma vez que o metanol é tóxico, está-se pesquisando o uso de etanol na produção de ésteres etílicos. Este último processo é considerado interessante porque se produz um combustível totalmente agrícola (Bouaid *et al.*, 2007 a, b; Metzger & Bornscheuer, 2006; Piazza & Foglia, 2001).

Vochysia tucanorum apresenta de 21,5% a 29,6% de ácido erúcico no óleo de suas sementes (Mayworm & Salatino, 2002), podendo se tornar futuramente uma rica fonte de combustível renovável, uma vez que as árvores produzem muitos frutos, com três sementes cada. Em 1 Kg contêm aproximadamente 39.800 sementes (Lorenzi, 1992).

Atualmente, o nível de colesterol no organismo é uma preocupação relevante na manutenção da saúde humana. Vários estudos têm revelado que a ingestão de ácido esteárico diminui a absorção de colesterol (Kris-Etherton & Mustad, 1994; Baer *et al.*, 2003; Vinson *et al.*, 2006; Guderian *et al.*, 2007; Mehta *et al.*, 2007). Há evidências de que a manteiga de cacau,

devido ao seu alto teor de ácido esteárico, é hipocolesterolêmica em comparação com a manteiga comum (Kris-Etherton *et al.*, 1993).

Bruce & Salter (1996) e Emken *et al.* (1993) sugerem que o comportamento do ácido esteárico em não elevar os níveis de colesterol se deve à alta conversão deste em ácido oleico.

Atualmente, existe um crescente interesse por lipídeos como carreadores de drogas para uso farmacológico. Attama *et al.* (2006) verificaram que misturas contendo 50% e 75% de gordura de cacau podem ser aplicadas em formulações de nanopartículas de lipídeos sólidos e lipídeo nanoestruturado de carreamento.

1.3. Genética e Marcadores Moleculares

Quando não havia mais dúvidas da existência dos genes e de sua localização nos cromossomos, os cientistas começaram a investigar como era possível uma quantidade tão grande de informações complexas estarem contidas neles. Ainda no século passado, foi proposta a idéia de que os cromossomos contêm as informações transferidas de uma geração para a outra, ou seja, material hereditário. Entretanto, a identificação e descrição do DNA como a molécula que contém esta informação só ocorreu no início da década de 1950 (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Raven *et al.* 2007).

Até meados da década de 60, os genes associados a caracteres morfológicos, como nanismo, deficiência clorofítica, cor da pétala e morfologia foliar eram utilizados como marcadores em estudos de genética e melhoramento de plantas, os quais contribuíram muito para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para a construção das primeiras versões de mapas genéticos (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Esses marcadores tradicionais utilizados para estudar a diversidade botânica foram refinados através do uso de microscopia eletrônica, e de dados bioquímicos e fitoquímicos. Entretanto, apesar de serem extremamente úteis, as técnicas envolvendo DNA apresentam-se mais eficientes, devido à imensa quantidade de características que elas revelam, as quais superam todas as desvantagens das técnicas anteriores, identificando polimorfismos a nível de sequência de DNA. Além disso, são independentes de influências ambientais e podem utilizar todo o genoma (Karp *et al.* 1996; Laurentin, H. 2009).

Atualmente, diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis para a detecção da variabilidade genética ao nível de sequência de DNA, ou seja, para a detecção de polimorfismos genéticos. Essas técnicas permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados “marcadores moleculares” em um número virtualmente ilimitado, cobrindo todo o genoma do organismo (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Os marcadores moleculares são definidos, portanto, como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um segmento específico de DNA, correspondente a regiões expressas ou não do genoma, nos quais a sequência de seus nucleotídeos e a sua função podem ou não ser conhecidas. São utilizados tanto no estudo de genética como na prática de melhoramento de plantas e podem ser utilizados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, desde que se possa obter suficiente DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Nas técnicas de biologia molecular, a utilização de enzimas de restrição permitiu a análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição de DNA. Mais recentemente, com o desenvolvimento do processo de amplificação de DNA utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR: polymerase chain reaction), a qual permite que qualquer porção do DNA seja amplificada em um período de tempo relativamente curto, houve uma revolução na aplicabilidade de métodos moleculares. Dessa maneira novas tecnologias e novos marcadores moleculares foram desenvolvidos. Resumindo, os caminhos foram abertos para uma mudança no paradigma genético básico: da inferência do genótipo a partir do fenótipo, onde Mendel foi pioneiro, para a análise genética direta da variação na sequência de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Raven *et al.* 2007; Karp *et al.* 1996).

Atualmente, um grande número de marcadores moleculares altamente polimórficos pode ser obtido em qualquer organismo vivo, através de diversas técnicas como, por exemplo, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorfism) (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Karp *et al.* 1996).

1.3.1. Importância da Técnica de AFLP

Uma variedade de diferentes técnicas moleculares pode ser usada para estudar a diversidade botânica (Karp *et al.* 1996). Procedimentos baseados em técnicas de biologia

molecular são atualmente usados para estimar graus de divergência genética entre populações e espécies de plantas. Técnicas moleculares com ácidos nucleicos têm sido aplicadas em estudos envolvendo táxons arbóreos, revelando graus elevados de polimorfismo entre populações. Entre as técnicas que não requerem seqüenciamento, uso de sondas ou bibliotecas genômicas, sobressai-se atualmente o AFLP. Essa técnica representa uma tecnologia recente para a obtenção de um grande número de marcadores moleculares distribuídos em genomas de procariotos e eucariotos, ou seja, pode ser usada para DNAs de qualquer origem ou complexidade (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Vos *et al.* 1995; Fay *et al.* 2005), fornecendo altos níveis de resolução, a fim de permitir o delineamento de estruturas genéticas complexas (Robinson & Harris, 1999).

A técnica de AFLP combina a especificidade, a resolução e o poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição, com a velocidade e praticidade de detecção do polimorfismo via PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

As enzimas de restrição, também chamadas de endonucleases de restrição, reconhecem seqüências específicas da dupla-fita de DNA conhecidas como seqüências de reconhecimento. Estas seqüências apresentam 4 a 6 nucleotídeos e são sempre palindrômicas (uma fita é igual a outra quando lida em sentido oposto). As enzimas clivam o DNA nas suas seqüências de reconhecimento específicas. Algumas enzimas clivam as duas fitas de forma alinhada, outras deixam uma das fitas com alguns nucleotídeos a mais, criando as chamadas extremidades coesivas (Raven, *et al.* 2007).

As impressões digitais são produzidas sem o conhecimento prévio da seqüência, usando-se um iniciador. Como as condições de reação dos iniciadores utilizados são rigorosas, a técnica de AFLP é considerada segura. Desde o seu desenvolvimento e divulgação, essa técnica tem sido utilizada de forma crescente para o mapeamento genético localizado, e construção de mapas genéticos, principalmente em espécies de plantas cultivadas que apresentam uma baixa taxa de polimorfismo de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Vos *et al.* 1995).

Empregada inicialmente com interesses agrônômicos, a técnica vem se estendendo para outros campos de investigação científica. Por exemplo, Comes & Abbott (1998) fizeram

inferências filogeográficas de populações de *Senecio gallicus* (Asteraceae), baseadas em fragmentos de restrição de cpDNA.

Kropf *et al.* (2002) usaram a combinação do seqüenciamento de ITS com marcadores AFLP para o estudo de populações de *Anthyllis montana* (Fabaceae), espécie que habita diversas montanhas européias. Abordagem semelhante foi utilizada por Zhang *et al.* (2001) no estudo fitogeográfico de populações de *Soldanella* (Primulaceae). Marcadores AFLP permitiram a detecção de diferenças genéticas entre populações de *Eritrichium nanum* dos Alpes centrais e de refúgios periféricos (Stehlik *et al.* 2001). Os marcadores AFLP têm sido úteis também em estudos de comparação entre populações, independentemente de sua localização corresponder ou não a refúgios. Por exemplo, Dodd *et al.* (2002) avaliaram as diferenças genéticas entre populações de *Avicennia germinans* (Avicenniaceae) do Pacífico e do Atlântico, comparando populações de um lado e do outro das Américas e populações exclusivamente do Atlântico e do Pacífico. AFLP permitiu também a detecção de diferenças genéticas entre populações de *Iris pseudacorus* de diferentes bacias hidrográficas (Lamote *et al.* 2002). Análise de polimorfismos genéticos a partir de AFLP sugere que *Arabidopsis thaliana* colonizou a porção central e setentrional da Europa a partir de refúgios pleistocênicos da Ásia e do Mediterrâneo (Sharbel *et al.* 2000). Schonswetter *et al.* (2003) utilizaram a técnica AFLP em populações de *Ranunculus glacialis* L. (Ranunculaceae) para elucidar a migração histórica do táxon. Esse recurso vem sendo utilizado por Schonswetter *et al.* (2004), para avaliar afinidades genéticas entre populações disjuntas nos Alpes, bem como por Sgorbati *et al.* (2004), com *Puya raimondii* (Bromeliaceae) nos Andes do Peru e Bolívia.

Tremetsberger *et al.* (2003) utilizaram a técnica AFLP para analisar variações genéticas inter e intra-específicas de populações de *Hypochaeris acaulis* (Asteraceae) na região meridional dos Andes da América do Sul.

Mais recentemente, Gottlieb *et al.* (2005) a fim de tornar mais claras as relações entre membros de *Illex* representativos do sudeste da América do Sul utilizou análise de AFLP e de ITS, combinando-as, posteriormente. As topologias obtidas por AFLP e pelos dados de ITS, sozinhas e combinadas, demonstraram a existência de dois grupos, com uma relação distante entre eles, mostrando uma incongruência com os tratamentos taxonômicos.

Ledru *et al.* (2007), utilizaram dados botânicos, palinológicos e genéticos para caracterizar a distribuição do gênero *Podocarpus*, representado no Brasil por três espécies (*P. sellowii*, *P. lambertii* e *P. brasiliensis*). Demonstraram que *P. sellowii* expandiu-se desde o norte até a região central há 16.000 anos (entre 5° e 15° S); populações tanto de *P. sellowii* quanto de *P. lambertii* expandiram-se em diferentes épocas desde a última glaciação (entre 15° e 23° S); e *P. lambertii* apareceu durante a recente expansão das florestas de *Araucaria* (entre 23° e 30° S). *P. brasiliensis*, cuja única coleta foi feita no Distrito Federal, não foi distinta de *P. sellowii*, demonstrando que sua identificação precisa ser revista.

Artigos mais recentes (Arango-Ulloa, *et al.*, 2009; Buerki, *et al.*, 2009; Cui-Ping *et al.*, 2009; Pamidiamarri *et al.*, 2009) utilizaram a técnica de AFLP para verificar a variabilidade genética entre espécies e entre regiões, além de estabelecer relações filogenéticas entre espécies.

Muitos dos estudos realizados utilizando a técnica AFLP tem por finalidade o desenvolvimento de estratégias de manejo para conservação entre espécies, como os trabalhos de Shanjani *et al.* (2009) e Rozo *et al.* (2009). AFLP e RAPD foram utilizadas por Garcia *et al.* (2009) em conjunto com medidas de distância genética e técnicas estatísticas concluindo que existe variação dentro da espécie *Bromus setifolius*, nativa da Patagônia.

A técnica também foi utilizada por Bouftass *et al.* (2010) para examinar a diversidade genética do patógeno *Puccinia recondita*, fungo que provoca a ferrugem nas folhas de algumas espécies de trigo, e determinar como a variação genética é distribuída dentro e entre diferentes locais de cultura do trigo.

1.3.2. AFLP caracteriza-se por quatro etapas

A primeira etapa consiste na digestão (clivagem) do DNA genômico total do indivíduo com duas enzimas de restrição, uma de corte raro (Ex.: EcoRI que reconhece de 6 a 8 pares de bases) combinada com uma de corte freqüente (Ex.: MseI que reconhece 4 pares de bases). Nessa clivagem são geradas 3 classes de fragmentos: (1) fragmentos grandes resultantes da clivagem pela enzima de corte raro em ambas as extremidades (EcoRI + EcoRI); (2) fragmentos pequenos resultantes da clivagem pela enzima de corte freqüente em ambas as extremidades (MseI + MseI); (3) fragmentos de tamanhos intermediários resultantes da

clivagem combinada raro/frequente (EcoRI + MseI) (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Estes tipos de fragmentos gerados serão muito importantes nas etapas seguintes porque apenas os fragmentos (1) e (3) serão visualizados.

A segunda etapa consiste na ligação de adaptadores específicos de EcoRI e MseI que possuem terminais complementares às extremidades resultantes da digestão pelas enzimas de restrição. Esses adaptadores são ligados aos terminais dos fragmentos de DNA para gerar moldes para as etapas seguintes de amplificação. A sequência dos adaptadores e os locais de restrição adjacentes servem como locais de ligação dos iniciadores para a subsequente amplificação dos fragmentos de restrição. Esses adaptadores possuem de 20 a 30 pares de bases. As seqüências dessas bases são diferentes para cada adaptador. Portanto, um grande número de fragmentos é gerado, sendo necessárias algumas etapas de seleção dessa grande quantidade de fragmentos para que a análise seja viável (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Vos *et al.* 1995).

Quando se trata de genomas complexos normalmente a terceira etapa é dividida em duas fases: a primeira, chamada de amplificação pré-seletiva, consiste em uma pré-seleção de fragmentos a serem amplificados. Ela é constituída da seqüência específica de 20 a 25 nucleotídeos complementares à seqüência dos adaptadores mais um único nucleotídeo seletivo adicional de seqüência arbitrária na sua extremidade 3'. A especificidade nessa extremidade é crucial, uma vez que é justamente a partir da extremidade 3' que a polimerização se inicia. Com isso, os iniciadores somente vão hibridizar com aqueles fragmentos que possuírem seqüência complementar à sua seqüência arbitrária adicional formando uma subpopulação de fragmentos (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Vos *et al.* 1995). Na segunda fase, chamada de amplificação seletiva, os iniciadores utilizados possuem mais dois nucleotídeos arbitrários adicionais. Como possui um maior número de nucleotídeos adicionais, a seleção é bem mais significativa. Nessa etapa, os iniciadores que se dirigem ao adaptador para o corte da enzima rara (EcoRI) tem seu terminal 5' marcado com radioisótopos ou marcadores fluorescentes. Por isso, apesar de todas as três classes de fragmentos serem amplificadas, somente os fragmentos amplificados a partir de pelo menos um adaptador para corte raro (EcoRI) serão visualizados, ou seja, somente as classes (1) e (3) de fragmentos

descritas na primeira etapa. A classe (1) de fragmentos possui um tamanho médio por volta de 4 a 5Kb e em uma análise através de eletroforese em gel de poliacrilamida estes fragmentos migram muito pouco ficando retidos na porção superior. Já os fragmentos de tamanhos intermediários resultantes da clivagem combinada rara/freqüente (EcoRI/MseI) são os fragmentos visualizados claramente na análise de AFLP. Os fragmentos de tamanho menor (MseI) não são observados no gel por não serem marcados (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Vos *et al.* 1995).

Na quarta e última etapa, os fragmentos selecionados podem ser separados e verificados em gel de alta resolução como um gel de poliacrilamida com marcação radioativa ou em um seqüenciador automático de DNA, através de marcação por fluorescência. Potencialmente, apenas o sequenciamento de fragmentos, mesmo manualmente, pode resolver todas as diferenças possíveis entre as amostras (AFLP Plant Mapping Protocol, Applied Biosystems, 2000; Ferreira & Grattapaglia, 1995; Vos *et al.* 1995; Karp *et al.* 1996).

1.3.3 Vantagens na utilização da técnica AFLP

O sucesso da técnica AFLP é principalmente devido aos altos níveis de polimorfismos revelados, seu valor sendo virtualmente ilimitado e muito eficiente na ampla amostragem de um genoma. A habilidade de diferenciar indivíduos dentro de populações torna a técnica útil para análises de paternidade, experimentos com fluxo genético e também para o registro da variedade de plantas. Entretanto, podem produzir informações duvidosas sobre relações entre táxons distantes (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Vos *et al.* 1995; Robinson & Harris, 1999; Fay *et al.* 2005).

A maioria dos fragmentos corresponde a posições únicas no genoma, e, portanto, podem ser explorados como pontos de referência em mapas genéticos e físicos, cada fragmento sendo caracterizado por seu tamanho e o iniciador utilizado na amplificação. Como os fragmentos são gerados pelo genoma total, não há risco de se basear as análises de parentesco apenas em algumas regiões alterando o resultado das relações evolutivas (Vos *et al.* 1995; Robinson & Harris, 1999).

Como a técnica AFLP é uma ferramenta muito eficiente na detecção de variabilidade genética através da obtenção de marcadores (fragmentos de restrição) polimórficos, cobrindo uma grande parte do genoma, estes fragmentos polimórficos podem ser usados para construir mapas genéticos, impressões digitais (“fingerprinting”) e as distâncias genéticas podem ser calculadas entre os genótipos (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Vos *et al.* 1995; Karp *et al.* 1996).

Uma vez que o ensaio AFLP não requer informação prévia de sequência de DNA, permite a detecção de fragmentos de restrição em qualquer contexto ou complexidade incluindo exemplares ou segmentos clones de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Vos *et al.* 1995; Robinson & Harris, 1999).

Como o DNA é amplificado, pequena quantidade de material é suficiente para realizar as análises, sendo um fator muito importante quando se trabalha com plantas de difícil acesso (Robinson & Harris, 1999; Fay *et al.* 2005).

1.3.4. Limitações da técnica AFLP

Os reagentes necessários para realizar a análise AFLP como enzimas de restrição, adaptadores e iniciadores específicos são caros e necessitam de um investimento alto do laboratório. Os iniciadores necessitam ser marcados. Se essa marcação for feita por fluorescência, utiliza-se um seqüenciador, equipamento de alto custo. Além disso, precisa-se adquirir também os softwares para AFLP (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Robinson & Harris, 1999).

A escolha do iniciador, por exemplo, com relação aos Kits da Applied Biosystems, para genoma grande (4 nucleotídeos extras), regular (3 nucleotídeos extras) ou pequeno (2 nucleotídeos extras), pode influenciar no número de fragmentos amplificados e no nível de polimorfismos encontrados (Robinson & Harris, 1999).

A técnica AFLP tende a ser bem reprodutiva, mas também muito exigente, e requer uma boa qualidade de DNA. Um DNA de alto nível de pureza é necessário para garantir uma digestão completa pelas enzimas de restrição. Se ocorrer digestão parcial do DNA, surgem sérios problemas de interpretação dos polimorfismos. Em outras palavras, a má digestão do

DNA é a principal fonte de artefatos polimórficos na análise AFLP (Karp *et al.* 1996; Ferreira & Grattapaglia, 1995; Robinson & Harris, 1999).

Os marcadores AFLP são marcadores dominantes, sendo sua principal limitação, o baixo conteúdo de informação genética por loco, isto é, a informação se refere apenas ao fragmento amplificado. As demais variações alélicas são classificadas como um alelo nulo. Segundo Ferreira & Grattapaglia 1995, genótipos heterozigotos não podem ser diretamente discriminados dos homozigotos, apesar de existirem estudos que sugerem a possibilidade de identificar heterozigotos a partir da intensidade de bandas ou picos obtidos por AFLP, uma vez que as bandas de marcadores heterozigotos possuem a metade da densidade de uma banda com marcadores homozigotos (Ferreira & Grattapaglia 1995; Robinson & Harris, 1999; Fay *et al.* 2005; Laurentin, H. 2009).

A homologia é talvez o maior problema da técnica AFLP porque a princípio não se conhece a sequência de nucleotídeos de cada fragmento. Além disso, a sequência de um fragmento em particular pode conter fragmentos de regiões diferentes do genoma e não existe modo de acessar a homologia de fragmentos perdidos. Rouppe van der Voort *et al.* (1997) através do estudo com *Solanum* (Solanaceae) verificou que 95% dos fragmentos obtidos eram quase idênticos. Segundo Rieseberg (1996) a homologia é proporcional à distância taxonômica. Não é uma questão simples de se responder, uma vez que os níveis de similaridade genética não são uniformes no reino vegetal. Portanto, uma visão mais conservadora do assunto nos leva a acreditar que acima do nível de espécie, o uso da técnica AFLP para produzir classificações e filogenias se torna injustificado (Robinson & Harris, 1999).

O conteúdo de DNA nuclear, medido em 1C (quantidade de DNA de um núcleo haplóide de um organismo medido em picogramas) pode variar o resultado da análise AFLP. No caso de angiospermas, este valor varia de 0,1 a 127,4 pg. A grande variação, a quantidade e as diferentes causas da evolução do conteúdo nuclear resultaram em uma alta repetitividade das sequências, pelo menos em alguns táxons, e esse fato teve um efeito marcante em muitos organismos. Por isso, o valor C do DNA tem sido conhecido como a característica chave na biologia e na biodiversidade. O AFLP™ Plant Mapping Protocol (Applied Biosystems), indica o uso do Kit Small para organismos com 1C entre 0,05 e 0,51 pg e o Kit Regular para organismos

com 1C entre 0,51 e 6,12 pg. Entretanto alguns autores já relataram dificuldades na obtenção de alta qualidade nos resultados usando a técnica AFLP padrão com angiospermas que possuem valores de 1C altos ($> 15\text{pg}$). Neste caso, os fragmentos são fracamente amplificados e poucos são marcados apresentando níveis de variação duvidosos (Fay *et al.* 2005).

Entretanto, algumas modificações podem ser feitas na análise padrão de AFLP, a fim de solucionar esses problemas. Uma delas é a mudança no número de bases em um ou dois dos iniciadores seletivos. Com a diminuição do número de bases, a qualidade dos fragmentos encontrados em espécies com genoma pequeno aumenta. Por outro lado, aumentando o número de bases dos iniciadores, ocorre a redução no número de fragmentos amplificados gerando melhores resultados para espécies com genoma grande (Fay *et al.* 2005).

Para analisar os fragmentos gerados pela técnica AFLP, os dados de presença (1) e ausência (0) dos mesmos são convertidos em uma matriz binária. Eventos de inserção e deleção de um local de restrição podem acontecer, provocando respectivamente aumento ou diminuição do fragmento, ou seja, causando uma mudança no tamanho do fragmento e provocando uma interpretação errônea de que ocorreu ganho ou perda de um fragmento de restrição. Dessa maneira, os dados de AFLP são considerados não-independentes (Robinson & Harris, 1999; Fay *et al.* 2005).

São necessárias duas etapas para construir os dendrogramas que mostram o resultado final das análises AFLP: 1) a conversão da matriz binária para uma matriz de distância e, 2) o uso da matriz de distância e de um programa de construção de árvores para construir o dendrograma. Esses programas são simples algoritmos e constroem um dendrograma sem levar em conta a qualidade dos dados. Como discutido acima, existem muitas causas possíveis de erros nas análises AFLP, as quais podem gerar problemas com o cálculo das distâncias genéticas produzindo um resultado incerto ao dendrograma (Robinson & Harris, 1999).

Na análise AFLP, as técnicas utilizadas para analisar as relações entre os grupos são técnicas de análise fenética, como agrupamento e ordenação, as quais são essencialmente análises de similaridade que procuram expressar a relação entre os indivíduos utilizando um

grande número de caracteres independentes, sem considerar eventos evolutivos que levaram à similaridade observada (Laurentin, H. 2009).

Estão sendo procuradas fontes alternativas potenciais de óleos de sementes para a produção de biodiesel, a fim de evitar que sementes utilizadas como alimento (soja, canola e milho, por exemplo) sejam desviadas de sua nobre função para se transformar em biocombustíveis. Devido às características dos triglicerídeos de sementes de *V. pyramidalis* e *V. tucanorum* procurou-se detectar populações com lipídeos dotados de perfis de ácidos graxos mais convenientes para eventual uso medicinal ou industrial.

Os fragmentos marcados por fluorescência são detectados num sequenciador automático de DNA, gerando eletroferogramas, nos quais os picos indicam a presença dos fragmentos.

Figura 3. Esquema representando o funcionamento da técnica AFLP.

2. OBJETIVOS

Um dos objetivos deste trabalho foi verificar as diferenças quali e quantitativas dos ácidos graxos de sementes em populações distintas de *Vochysia pyramidalis* e *Vochysia tucanorum* visando seu potencial econômico, tanto na obtenção de ácido esteárico (*Vochysia pyramidalis*), como de ácido erúcico (*Vochysia tucanorum*). Um segundo objetivo foi verificar, através da técnica de AFLP, se populações com composição de ácidos graxos distintos correspondem a linhagens geneticamente distintas

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Preparo do material botânico

Foram coletados frutos abertos ou semi-abertos de 3-9 indivíduos de 4 populações de *Vochysia pyramidalis* e de 5-10 indivíduos de 7 populações de *Vochysia tucanorum* nos locais descritos nas Tabelas 1 e 2. Em seguida foram levados ao sol para completar a abertura e liberação das sementes (Lorenzi, 1992). Após a liberação, as sementes foram acondicionadas em recipientes de vidro e mantidas em freezer (-20°C) até serem usadas para extração do óleo.

Foram coletadas folhas jovens (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Donini *et al.*, 1997) das mesmas populações e indivíduos de *Vochysia pyramidalis* e *Vochysia tucanorum*, nos locais descritos nas Tabelas 1 e 2. As foram divididas em pequenos fragmentos, e imediatamente colocadas em tubos Falcon hermeticamente fechados, contendo sílica como indicador de umidade. Os materiais foram assim mantidos até a ocasião da extração do DNA, com monitoramento freqüente das condições da sílica.

Tabela 1. Locais, números e datas de coleta de populações de *Vochysia pyramidalis*.

Indivíduos	Local de coleta	Data da coleta	Coletor / nº coleta	GPS
P1a-P1c	Alto Paraíso de Goiás (GO)	18/1/2009	msclemente 33	S14°09'37.9" W047°35'39.0"
P4a-P4i	UnB - Brasília (DF)	19/1/2009	msclemente 36	S15°45'27.6" W047°52'23.2"
P3a-P3i	Palmeiras (BA)	13/1/2009	msclemente 30	S12°31'45.9" W041°34'16.9"
P2a-P2h	Andaraí (BA)	11/1/2009	msclemente 27	S12°51'12.2" W041°18'38.2"

Tabela 2: Locais, números e datas de coleta de populações de *Vochysia tucanorum*.

Indivíduos	Local de coleta	Data da coleta	Coletor / nº coleta	GPS
T7a	Sengés (PR)	29/7/2008	msclemente 46	S24°07'00.9" W049°30'53.8"
T7b	Sengés (PR)	29/7/2008	msclemente 46	S24°07'00.9" W049°30'53.8"
T7c	Sengés (PR)	29/7/2008	msclemente 46	S24°07'01.5" W049°30'56.2"
T7d	Sengés (PR)	29/7/2008	msclemente 46	S24°09'25.1" W049°34'36.1"
T7e	Sengés (PR)	29/7/2008	msclemente 46	S24°09'25.1" W049°34'36.1"
T7f	Sengés (PR)	29/7/2008	msclemente 46	S24°09'25.1" W049°34'36.1"
T7g	Sengés (PR)	29/7/2008	msclemente 46	S24°09'24.9" W049°34'37.0"
	Sengés (PR)	29/7/2008	msclemente 46	S24°09'24.9" W049°34'37.0"
T2a	Botucatu (SP)	28/7/2008	msclemente 50	S22°53'36.2" W048°29'21.3"
T2b	Botucatu (SP)	28/7/2008	msclemente 50	S22°53'36.2" W048°29'21.3"
T2c	Botucatu (SP)	5/10/2008	msclemente 50	não tem
T2d	Botucatu (SP)	5/10/2008	msclemente 50	não tem
T2e	Botucatu (SP)	5/10/2008	msclemente 50	não tem
T2f	Botucatu (SP)	5/10/2008	msclemente 50	não tem

Tabela 2: (Continuação)

Indivíduos	Local de coleta	Data da coleta	Coletor / nº coleta	GPS
T1a	Bauru (SP)	19/11/2007	UNBA	S22°20'99.4" W049°01'89.8"
T1b	Bauru (SP)	19/11/2007	UNBA	S22°20'93.2" W049°01'85.9"
T1c	Bauru (SP)	19/11/2007	UNBA	S22°20'91.9" W049°01'81.5"
T1d	Bauru (SP)	19/11/2007	UNBA	S22°20'74.7" W049°01'79.7"
T1e	Bauru (SP)	19/11/2007	UNBA	S22°20'74.7" W049°01'79.7"
T1f	Bauru (SP)	19/11/2007	UNBA	S42°52'85.1" W055°49'85.3"
T1g	Bauru (SP)	19/11/2007	UNBA	S22°20'84.8" W049°01'84.2"
T3a	Santana do Riacho (MG)	9/9/2008	msclemente 58	S19°16'36.4" W043°32'58.2"
T3b	Santana do Riacho (MG)	9/9/2008	msclemente 58	S19°16'36.4" W043°32'58.2"
T3c	Santana do Riacho (MG)	9/9/2008	msclemente 58	S19°16'34.7" W043°32'58.5"
T3d	Santana do Riacho (MG))	9/9/2008	msclemente 58	S19°16'34.7" W043°32'58.5"
T3e	Santana do Riacho (MG)	9/9/2008	msclemente 58	S18°34'10.7" W043°33'39.9"
T6a	Perdões (MG)	18/9/2008	msclemente 59	S21°15'11.2" W045°08'18.5"
T6b	Perdões (MG)	18/9/2008	msclemente 59	S21°15'11.2" W045°08'18.5"
T6c	Perdões (MG)	18/9/2008	msclemente 59	S21°15'11.2" W045°08'18.5"
T6d	Perdões (MG)	18/9/2008	msclemente 59	S21°15'11.2" W045°08'18.5"
T6e	Perdões (MG)	18/9/2008	msclemente 59	S21°15'11.2" W045°08'18.5"
T6f	Perdões (MG)	18/9/2008	msclemente 59	S21°15'11.2" W045°08'18.5"
T4a	Brasília (DF)	2/9/2008	msclemente 64	S15°56'50.6" W047°52'33.0"
T4b	Brasília (DF)	2/9/2008	msclemente 64	S15°56'50.8" W047°52'33.0"
T4c	Brasília (DF)	2/9/2008	msclemente 64	S15°56'50.9" W047°52'32.4"
T4d	Brasília (DF)	2/9/2008	msclemente 64	S15°56'50.4" W047°52'31.9"
T4e	Brasília (DF)	2/9/2008	msclemente 64	S15°56'50.6" W047°52'32.9"

Tabela 2: (Continuação)

Indivíduos	Local de coleta	Data da coleta	Coletor / nº coleta	GPS
T4f	Brasília (DF)	2/9/2008	msclemente 64	S15°56'20.6" W047°53'12.3"
T4g	Brasília (DF)	2/9/2008	msclemente 64	S15°56'19.5" W047°53'12.3"
T4h	Brasília (DF)	2/9/2008	msclemente 64	S15°56'19.3" W047°53'12.0"
T4i	Brasília (DF)	2/9/2008	msclemente 64	S15°56'15.2" W047°53'43.1"
T4j	Brasília (DF)	2/9/2008	msclemente 64	S15°56'15.0" W047°53'42.4"
T5a	Ibicoara (BA)	12/9/2008	msclemente 53	S13°30'14.7" W041°27'36.9"
T5b	Ibicoara (BA)	12/9/2008	msclemente 53	S13°30'14.2" W041°27'36.9"
T5c	Ibicoara (BA)	12/9/2008	msclemente 53	S13°30'14.7" W041°27'36.6"
T5d	Ibicoara (BA)	12/9/2008	msclemente 53	S13°30'14.1" W041°27'37.0"
T5e	Ibicoara (BA)	12/9/2008	msclemente 53	S13°30'14.2" W041°27'37.1"
T5f	Ibicoara (BA)	12/9/2008	msclemente 53	S13°30'14.0" W041°27'36.7"
T5g	Ibicoara (BA)	12/9/2008	msclemente 53	S13°30'14.0" W041°27'36.5"
T5h	Ibicoara (BA)	12/9/2008	msclemente 53	S13°30'13.8" W041°27'36.3"
T5i	Ibicoara (BA)	12/9/2008	msclemente 53	S13°30'13.9" W041°27'36.3"
T5j	Ibicoara (BA)	12/9/2008	msclemente 53	S13°30'13.7" W041°27'36.2"

3.2. Metodologia

3.2.1. Extração dos óleos das sementes e derivação de seus ácidos graxos

Os triglicerídeos foram extraídos de amostras de sementes das populações de *Vochysia pyramidalis* e *Vochysia tucanorum*, previamente pesadas e mantidas em dessecador até peso constante. Posteriormente, essas sementes foram trituradas com N₂ líquido até a homogeneização. O material triturado foi mantido em dessecador por 24 horas antes do início da extração, sendo, posteriormente, acondicionado em sacos de papel de filtro e extraído em Soxhlet durante oito horas com *n*-hexano. Após a evaporação da maior parte do solvente em rotaevaporador, o óleo bruto foi transferido para frascos previamente pesados. As porções

restantes do solvente foram evaporadas sob corrente de nitrogênio e os vidros contendo óleo foram pesados e mantidos em dessecador até peso constante (Ahmad *et al.*, 1981).

Os ácidos graxos de uma alíquota de 30 µL de óleo das amostras de *Vochysia tucanorum* foram transesterificados por meio da adição de 4 mL de solução metanólica de H₂SO₄ 5% e 2 mL de tolueno. No caso de *Vochysia pyramidalis*, seu óleo foi dissolvido inicialmente em 1 mL de hexano e dessa diluição foram retirados 30 µL para o procedimento anteriormente descrito. Essas misturas foram mantidas por 4 horas a 80 °C em banho seco. Após esse período, foram adicionados 4 mL de NaCl 0,5M e 1 mL de CH₂Cl₂ (diclorometano). A solução foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos, e a fase orgânica foi separada em um novo tubo. Foram feitas mais duas extrações com CH₂Cl₂ e os extratos foram reunidos ao primeiro. Estes foram purificados por duas vezes com solução de NaCl 0,5M. Esta fase foi desprezada e ao extrato orgânico foi adicionado Na₂SO₄ anidro. Após o repouso de uma hora a solução foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e evaporado sob corrente de nitrogênio, obtendo-se assim os ácidos graxos metilados (Christie, 1982).

3.2.2. Identificação dos ácidos graxos

A análise dos ácidos graxos por meio de seus ésteres metílicos foi feita em cromatógrafo a gás HP 5890 ser. II Plus com FID, tendo como gás de arraste, Hélio com fluxo constante de 1 cm³.min⁻¹ e coluna capilar de sílica fundida HP-INNOWax (Cross-Linked PEG, 30 m x 0,32 mm x 0,5 µm), com a seguinte programação: temperatura inicial de 150°C durante 1 min, 15°C. min⁻¹ até 225°C, 5°C.min⁻¹ até 260°C, mantendo-se em 260°C por 7 min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 220°C e 275°C, respectivamente. A identificação dos ácidos graxos foi feita pela comparação dos tempos de retenção dos picos obtidos no cromatograma com aqueles de uma mistura de amostras autênticas.

Foi realizada uma análise de agrupamento pelo método UPGMA e coeficiente de Distância Euclidiana Simples. O programa utilizado nessas análises foi o Fitopac 1.6 (Shepherd, 2006).

Os dados também foram submetidos a uma análise de componente principal (PCA) referente aos constituintes de ácidos graxos, utilizando-se o software Fitopac 1.6 (Shepherd, 2006).

3.2.3. AFLP

3.2.3.1. Extração e Quantificação do DNA

O DNA das amostras foi extraído a partir de 20 mg de fragmentos de folhas secas. Esses fragmentos foram tratados com nitrogênio líquido em microtubos de 1,5 mL e triturados com o auxílio de pequenos pistilos de teflon. A extração do DNA foi feita com solução tampão de extração CTAB 2x (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris-Cl pH 8 100 mM, PVP-polivinilpirrolidona 1%, 2-mercaptoetanol 0,8%), de acordo com Doyle & Doyle (1987), modificado por Ferreira & Grattapaglia (1996). Esse protocolo é indiscutivelmente o mais amplamente utilizado com espécies vegetais, particularmente para a extração a partir de pequenas amostras de tecido. O detergente catiônico CTAB (cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide) solubiliza as membranas celulares; a presença do NaCl é necessária para a solubilização e ação do CTAB e também para permitir a precipitação do DNA na presença do álcool; o EDTA é incluído para inibir enzimas dependentes de metais principalmente DNAses que podem surgir com o rompimento das células; o tampão Tris-Cl possui o pH 8 para evitar o pH ótimo de enzimas degradativas; o PVP tem efeito antioxidante perante compostos fenólicos; o 2-mercaptoetanol é um agente redutor que protege o DNA contra a atividade de enzimas tais como peroxidases e polifenoloxidasas, desnaturando-as. Após o tecido vegetal ser ressuspensionado no tampão de extração, a suspensão é submetida a uma temperatura de 60-65°C por 30 minutos para facilitar sua solubilização e homogeneização. Na próxima etapa, a suspensão é submetida a uma extração com a mistura clorofórmio-álcool isoamílico para reter lipídios, proteínas e a maioria dos polissacarídeos. O isopropanol é adicionado à fase aquosa onde estão DNA, RNA e alguns polissacarídeos para precipitar o DNA e formar o pellet que em seguida é lavado duas vezes com etanol. Nessa etapa foi necessário ampliar o tempo de permanência da amostra com o isopropanol para duas semanas em freezer para melhor precipitação do DNA. Finalmente, ao pellet de DNA é adicionada água MilliQ contendo RNase

para degradar o RNA, restando apenas o DNA genômico desejado (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

A qualidade do DNA obtido foi avaliada por análise eletroforética em gel de agarose 1% contendo Gel Red (1:500), usando-se tampão TAE 1X (Sambrook *et al.* 1989).

As etapas de extração estão descritas no protocolo de extração no Anexo 1.

A quantidade relativa de DNA extraído foi medida através de uma técnica bastante simples que compara por intensidade de fluorescência à luz UV as amostras coradas com Gel Red, tendo como padrão, Lambda DNA de concentração conhecida. Em parafilm "M" foram depositadas 1 µL das amostras e 1 µL de padrão Lambda DNA com concentrações crescentes: 25 ng, 50 ng, 75 ng, 100 ng para os indivíduos de populações de *Vochysia tucanorum*, e 25 ng, 50 ng, 75 ng, 100 ng e 150 ng para os de *Vochysia pyramidalis*. Foram adicionados 2 µL de Gel Red (1:500) e 1 µL de solução tampão TE pH 8 (10 mM TrisCl pH 8 + 1 mM EDTA pH 8) sobre as amostras e os padrões. Comparou-se então a fluorescência das amostras com aquelas do padrão nas concentrações descritas. (Sambrook *et al.* 1989; Ausubel *et al.* 2003; Ferreira & Grattapaglia, 1995).

3.2.3.2. Reação de restrição (digestão)

Todos os procedimentos envolvendo reações de restrição, ligação e amplificação seguiram as instruções do protocolo da Applied Biosystems, "AFLP Plant Mapping Protocol".

O protocolo da Applied Biosystems recomenda a realização simultânea das reações de digestão (restrição) e ligação. No entanto, em outros trabalhos do laboratório, foram obtidos melhores resultados com a realização inicialmente da reação de digestão, seguindo-se a reação de ligação.

A reação de digestão foi realizada de acordo com o protocolo descrito no Anexo 2 utilizando-se as enzimas de restrição EcoR1 e Mse1 (Invitrogen TM) e a solução tampão T4 DNA-ligase Buffer 5x (Invitrogen TM). Vários testes foram realizados modificando-se as quantidades de DNA das amostras, a fim de se chegar ao final do processo com um resultado satisfatório. Essa quantidade variou em *Vochysia tucanorum* de 145 ng a 300 ng e em *Vochysia pyramidalis* de 120 ng a 300 ng.

3.2.3.3. Reação de ligação

Para a reação de ligação dos adaptadores, descrita no Anexo 3, foram utilizados o tampão T4 DNA ligase Buffer 5x (Invitrogen TM), NaCl 0,5 M, BSA 1 mg/mL (bovine serum albumin) (Invitrogen TM), os adaptadores Mse1 e EcoR1 (Applied Biosystems) e a enzima T4 DNA-ligase (Invitrogen TM).

3.2.3.4. Reação de amplificação pré-seletiva

Nessa etapa todos os reagentes utilizados fazem parte do kit da Applied Biosystems. Antes de iniciar a reação de amplificação pré-seletiva, foram feitos alguns ajustes no protocolo original. Assim, para *Vochysia tucanorum*, o produto da reação de ligação foi diluído 1:10 em água MilliQ e para *Vochysia pyramidalis*, o produto da reação de ligação foi utilizado sem diluição. Em seguida, foi utilizado o protocolo conforme Anexo 4. Para *Vochysia tucanorum* foi utilizado o Kit Regular da Applied Biosystems que possui três pares de bases tanto para EcoRI como para MseI, enquanto para *Vochysia pyramidalis* foi utilizado o Kit Small da Applied Biosystems, que possui dois pares de base para o EcoRI e três para o MseI. O kit Regular geralmente é utilizado quando se possui uma boa quantidade de DNA, pois necessita de uma quantidade maior de DNA do que o kit Small. A amplificação foi feita em termociclador Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2400.

A avaliação do resultado obtido foi feita com 4 µL da solução do produto pré-amplificado, através de eletroforese (40 V) em gel de agarose 1,5 % em TEB 1x em presença de Gel Red, usando os marcadores moleculares “100 bp DNA Ladder” (Gibco BRL).

3.2.3.5. Reação de amplificação seletiva

Para a reação de amplificação seletiva, foram utilizados os produtos da amplificação pré-seletiva com diluição 1:10, embora em alguns casos não foi feita diluição alguma. Utilizou-se o protocolo conforme Anexo 5. Após serem testadas várias combinações com os iniciadores EcoRI e MseI foram utilizadas quatro delas para os indivíduos das populações de *Vochysia tucanorum*: ACG-CAA, AGG-CTG, ACT-CAA e ACA-CTG. Para os indivíduos das populações de *Vochysia pyramidalis* foram utilizadas três combinações de iniciadores: AC-CTG, AC-CAT e AC-CTA.

A reação de amplificação foi feita em termo-ciclador Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2400.

A análise dos fragmentos amplificados foi realizada em seqüenciador automático ABI 310. Para a análise, 2 µL da amostra amplificada seletivamente foram adicionados a 11 µL de formamida (agente desnaturante) e 0,2 µL de solução de padrões internos para determinação dos comprimentos dos fragmentos amplificados (GeneScan-500 "Rox", Applied Biosystems); o "Rox" contém oligonucleotídeos com 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 e 500 pb. A mistura foi tratada por 5 min a 95°C em termociclador (PCR) para desnaturação das duplas fitas antes de ser colocada no seqüenciador.

Para análise dos comprimentos dos fragmentos separados na análise eletroforética, foi usado inicialmente o programa ABI Prism GeneScan Analysis Software 3.1.2 (Applied Biosystems, 1998) e posteriormente foi implantado e utilizado o programa Gene Mapper Software 4.1 (Applied Biosystems, 2009), rejeitando-se picos com intensidades inferiores a 50, pois valores mínimos muito baixos podem ser gerados por fragmentos originados de contaminação dos iniciadores ou outros produtos da reação de amplificação que não fazem parte da análise, e valores muito altos podem eliminar picos polimórficos importantes. Portanto, foram selecionados para a análise os fragmentos com comprimentos entre 50- 500 pb. Essa etapa foi refinada com a análise manual dos fragmentos porque o programa muitas vezes considera picos que apresentam aparência duvidosa podendo provocar erros no resultado final.

A próxima etapa da análise consistiu em converter os eletroferogramas com os fragmentos selecionados em uma matriz de presença e ausência (tipo 0 e 1) através dos programas ABI Prism GenoTyper Software 2.5 (Applied Biosystems, 1998) e Gene Mapper Software 4.1 (Applied Biosystems, 2009) e refinada manualmente.

Foi realizada uma análise de evolução mínima, através do método de distância mínima (Neighbor Joining) de Saitou & Nei (1987). A medida de distância genética usada foi a de Nei & Li (1979). O programa utilizado nessas análises foi o PAUP, versão 4.0 (Swofford, 2002). A consistência da monofilia dos ramos foi avaliada através da replicação "bootstrap" (Felsenstein, 1985).

Os dados foram submetidos a uma análise de ordenação com suas coordenadas principais (PCO), utilizando-se o software Fitopac 1.6 (Shepherd, 2006), a fim de avaliar a distância genética entre as espécies, através de um gráfico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Óleos fixos de sementes

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos para os teores de óleo de indivíduos de *Vochysia pyramidalis* das quatro localidades analisadas. Todas as populações mostraram variação no teor de óleo de seus indivíduos, o que se pode notar pelos altos desvios padrões obtidos. A população de Andaraí (BA) foi a que apresentou a maior uniformidade entre seus indivíduos. Dos três indivíduos coletados na população de Alto Paraíso de Goiás (GO), na Chapada dos Veadeiros, dois deles apresentaram teores muito próximos e extremamente baixos (1,84% e 1,37%), quando comparado com os das outras populações.

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para os teores de óleo de indivíduos de *Vochysia tucanorum* das sete populações analisadas. Dentre elas, a de Bauru-SP apresentou as maiores porcentagens de óleo, embora com uma variação também grande (12,78%-32,88%). Sengés-PR mostrou os menores teores de óleo (2,66%-11,54%) com uma grande variação entre seus indivíduos. As populações de Botucatu-SP (19,52%), Santana do Riacho-MG (18,50%), Perdões-MG (21,67%), Brasília-DF (19,54%) e Ibicoara-BA (16,50%) apresentaram uma maior uniformidade no teor de óleo de seus indivíduos, o que pode ser verificado por seus desvios padrões. Estes valores são semelhantes ou às vezes até superiores aos encontrados em várias fontes comerciais como soja (12-24%), girassol (22-36%), algodão (19%), tungue (16-18%), canola (2-49%) e milho (2-5%) (Simpson & Ogorzaly, 1995).

Comparando-se os teores de óleo de indivíduos de *V. pyramidalis* e *V. tucanorum*, nota-se que a última possui teores muito mais altos do que os da primeira, com exceção da população de Sengés (Tabelas 3 e 4).

Mayworm (1999) analisou sementes de *V. tucanorum* de três localidades (Mogi Guaçu e Bauru-SP, e Vitória da Conquista-BA) quanto aos seus teores de óleo. Essa quantidade variou muito pouco entre as populações (25,8%, 27,6% e 28,4%, respectivamente). Deve-se notar, entretanto, que nesse trabalho foi analisado apenas um indivíduo de cada população. Quanto ao espécime de Bauru, o resultado obtido no presente trabalho não diferiu muito daquele obtido pelo autor, uma vez que a análise resultou numa média de 26,09%. Houve uma variação grande entre os representantes da Bahia, pois a análise de Mayworm apresentou um valor de 28,4% e neste trabalho encontrou-se 16,50%, (Tabela 4). Entretanto, os locais de coleta não foram os mesmos. A população analisada neste trabalho foi coletada no município de Ibicoara (Chapada Diamantina), uma região de serras, situada no centro do estado da Bahia, característica por seus campos de altitude (campos rupestres), enquanto o espécime de Mayworm era do sul da Bahia (município de Vitória da Conquista).

Quanto aos teores de óleo das sementes de *V. pyramidalis*, notou-se uma grande diferença entre as coletadas no presente trabalho e aquelas analisadas por Mayworm (1999). Novamente, deve-se lembrar que o autor analisou apenas um indivíduo de cada população. Os teores de óleo das plantas avaliadas por Mayworm variaram entre 23,2% e 31,6%, enquanto aqui a maior média obtida foi de 13,71% para os indivíduos da população de Andaraí (BA) (Tabela 3). O indivíduo coletado por Mayworm em Palmeiras (BA) apresentou um teor de óleo de 31,6%, enquanto a média obtida no presente trabalho, relacionando nove indivíduos, foi de 10,96%, variando de 3,35% até 17,02% (Tabela 3). Deve-se lembrar que Mayworm coletou esta espécie no mês de abril, enquanto que a coleta do presente trabalho foi realizada em janeiro; talvez essa diferença se deva ao grau de maturação das sementes.

Com relação à distribuição de ácidos graxos nos óleos de *V. pyramidalis*, notou-se uma predominância de ácido oléico (38,4% - 53,3%), seguida do ácido esteárico (14,9% - 35,0%) nos indivíduos das populações de Andaraí, Palmeiras e Brasília (Tabela 5, Figs 4-7). Houve, entretanto, uma grande diferença na distribuição dos ácidos graxos entre os indivíduos coletados no município de Alto Paraíso de Goiás (Chapada dos Veadeiros), o indivíduo P1c sendo muito semelhante aos das populações anteriores, enquanto os indivíduos P1a e P1b se mostraram completamente diferentes, com muitas substâncias não identificadas; entre os

ácidos graxos identificados, houve um predomínio de ácido palmítico e de ácido linoléico (Tabela 5, Fig. 7). Uma característica interessante é que nenhuma outra população apresentou ácido linolênico, com exceção dos indivíduos da Chapada dos Veadeiros (Tabela 5, Figs 4-7).

A distribuição dos ácidos graxos das sementes de indivíduos de populações de *Vochysia tucanorum* mostrou vários padrões distintos: a) as populações de Bauru, Botucatu, Santana do Riacho e IBGE apresentaram principalmente $C_{20:1}$ e $C_{22:1}$, seguido de $C_{18:1}$ e $C_{18:2}$ (Tabela 6, Figs 8, 9, 13 e 14); b) as populações de Perdões e Ibicoara apresentaram predominantemente $C_{20:1}$, seguido de $C_{18:1}$ e $C_{22:1}$ (Tabela 6, Figs 10 e 11); c) os indivíduos de Sengés apresentaram principalmente $C_{18:1}$ e $C_{18:2}$ (Tabela 6, Fig. 12), embora o indivíduo 3 tenha se mostrado atípico, pois a quantidade de ácido linoléico que nos outros indivíduos da população esteve ao redor de 30%, neste indivíduo manteve-se ao redor de 1%. Os resultados obtidos para o ácido erúico ($C_{22:1}$) foram semelhantes aos encontrados por Mayworm & Salatino (2002), cujos teores variaram entre 21,5 e 29,6%. Deve-se notar também que o ácido linolênico, embora em quantidades pequenas, está presente em quase todos os indivíduos de todas as populações, com exceção daqueles de Bauru, que só apresenta esse ácido no indivíduo 1 (Tabela 6). Pode-se perceber pelo que foi mencionado acima que há diferenças na composição das várias populações de *V. tucanorum*.

Pode-se notar, entretanto, uma grande diferença entre as duas espécies. Enquanto, *V. pyramidalis* apresenta como constituintes principais de seus ácidos graxos $C_{18:0}$ e $C_{18:1}$, *V. tucanorum* tem como componentes principais, ácidos graxos de cadeias maiores e principalmente insaturadas, com $C_{20:1}$ e $C_{22:1}$, apresentando também $C_{18:1}$ e $C_{18:2}$ em quantidades expressivas.

Nas figuras 15 e 16 observam-se a separação de 3 grupos entre os indivíduos de *Vochysia pyramidalis*. Nota-se que os dois indivíduos da Chapada dos Veadeiros (P1a e P1b) que apresentam $C_{12:0}$ e $C_{14:0}$, além do ácido linolênico (Tabela 5), se separou totalmente dos outros indivíduos das outras populações, formando o que foi chamado de Grupo 1. Esses indivíduos já apresentaram diferenças no teor de óleo, o mais baixo entre todos os indivíduos analisados de *Vochysia pyramidalis* (Tabela 3). O indivíduo P1c, da Chapada dos Veadeiros, ficou próximo a dois indivíduos (P3c e P3f) da população de Palmeiras; esse grupo, chamado Grupo 2,

apresentou uma distribuição muito semelhante de seus ácidos graxos, principalmente com relação ao teor muito menor de ácido esteárico, que é característico do homogêneo Grupo 3 (Tabela 5). Neste, são encontrados como componentes principais, os ácidos oléico ($C_{18:1}$) e o esteárico ($C_{18:0}$), nos indivíduos das populações P2, P3 e P4 (Andaraí-BA, Palmeiras-BA e Unb-Brasília-DF, respectivamente) (Tabela 5).

Nas figuras 17 e 18 observa-se a formação de um grande Grupo 1, que apresenta como constituintes principais o ácido eicosenóico ($C_{20:1}$) e ácido erúcico ($C_{22:1}$), seguido pelo ácido oléico ($C_{18:1}$) e ácido linoléico ($C_{18:2}$). Este grupo é formado pela maioria dos indivíduos analisados de *Vochysia tucanorum* com exceção de alguns indivíduos da população T5 (T5f, T5h, Ibicoara-BA) e a maioria dos indivíduos da população T7 (Sengés-PR), que formou o Grupo 2 (Tabela 6). Este apresentou como diferenças, a presença de ácidos oléico, linoléico e linolênico em quantidades maiores que aquelas do Grupo 1; o ácido mirístico ($C_{14:0}$), embora em pequenas quantidades foi quase que exclusivo deste grupo. Além disso, os indivíduos T5f e T5h (Ibicoara-BA) aparecem próximos no dendrograma de afinidades por possuírem quantidades relativamente maiores de $C_{18:1}$ em comparação com os outros indivíduos da mesma população (Tabela 6).

Nas Figuras 19 e 20 as duas espécies, *Vochysia pyramidalis* e *Vochysia tucanorum* foram analisadas em conjunto para a realização do gráfico de ordenação (Fig. 19) e do dendrograma (Fig. 20). Nas duas figuras observa-se nitidamente a separação das duas espécies, sendo que todos os indivíduos de *Vochysia pyramidalis* permaneceram no eixo 1 do gráfico de ordenação e todos os indivíduos de *Vochysia tucanorum* no eixo 2. No dendrograma de afinidades (Fig. 20) forma-se também dois agrupamentos, separando as duas espécies. Essa separação provavelmente se deve a presença dos ácidos erúcico ($C_{22:1}$), ácido lignocérico ($C_{24:0}$) e ácido nervônico ($C_{24:1}$) em quase todos os indivíduos de *Vochysia tucanorum*, além de quantidades muito maiores de ácido eicosenóico ($C_{20:1}$) nesta espécie. Em *V. pyramidalis*, ($C_{22:1}$), ($C_{24:0}$) e ($C_{24:1}$) são quase inexistentes; deve-se notar também a presença significativa de ácido esteárico nesta espécie, em relação à *V. tucanorum* (Tabelas 5 e 6). Além disso, em *V. pyramidalis* somente foi constatada a presença de ácido linolênico ($C_{18:3}$) na população de Alto Paraíso de Goiás (GO) enquanto que em *V. tucanorum*, quase todos os indivíduos possuem

esse ácido. Os indivíduos P1a e P1b de *V. pyramidalis* mostram-se nitidamente separados das duas espécies, sugerindo que eles pudessem pertencer a uma outra espécie, diferente das duas aqui analisadas.

A distribuição de ácidos graxos de *V. pyramidalis*, com altos teores de ácido esteárico, é semelhante a de sementes de cacau (White, 1992), usada na produção de chocolate e manteiga de cacau, a última sendo importante na produção de batons, supositórios e óvulos, uma vez que o seu alto teor de ácido esteárico implica em alto ponto de fusão, razão pela qual a manteiga de cacau é geralmente sólida à temperatura ambiente. Em adição ao uso potencial na manufatura de cosméticos e produtos farmacêuticos, os óleos e gorduras com altas quantidades de ácido esteárico são interessantes também dieteticamente, pois tem sido mostrado que esse ácido não tem efeito nos níveis de colesterol sanguíneo, contrariamente aos efeitos de outros ácidos graxos saturados, como o ácido palmítico e mirístico (Crupkin & Zambelli, 2008).

Os conteúdos de óleos e a distribuição de ácidos graxos de *V. tucanorum*, similares aos óleos de *Crambe* e *Brassica* (ambos com predominância de ácido docosenóico) sugerem uma promissora utilização das sementes dessa espécie, não para propósitos alimentares, mas para a produção de lubrificantes (Piazza & Foglia, 2001) e como fluido de isolamento para transformadores, além de aditivo de asfalto (Metzger & Bornscheuer, 2006). Linhagens de *Brassica napus* com altas concentrações de ácido erúico ($C_{22:1}$), como as linhagens silvestres de “rapeseed” não estão atualmente disponíveis, tendo sido substituídas por variedades que produzem o óleo de canola, ricas em ácido oleico. Óleos ricos em ácido erúico (como se mostraram algumas populações de *V. tucanorum*) e seu derivado hidrogenado (ácido beênico) são atualmente importantes, não apenas para a produção de lubrificantes, mas também como surfactantes, detergentes, cosméticos e plásticos, entre outros usos.

Atualmente, espécies como *V. tucanorum* que produzem sementes com triglicerídeos constituídos por ácidos monoinsaturados são valiosas como possíveis fontes de óleos para a síntese de biodiesel. Triglicerídeos com a predominância tanto de ácidos graxos saturados como poliinsaturados são inconvenientes para a produção de biodiesel, o primeiro porque o produto obtido terá altos pontos de fusão, e o segundo porque o biodiesel produzido não

apresenta estabilidade oxidativa adequada (muitas insaturações tornam o produto vulnerável a peroxidação). Óleos adequados para a produção de biodiesel devem ser ricos em cadeias longas e pobres em ácidos graxos poliinsaturados (Pinto *et al.*, 2005), precisamente as características dos óleos de sementes de várias espécies de *Vochysia* (Mayworm & Salatino, 2002). *V. tucanorum*, como foi visto, apresenta ácidos graxos de cadeias longas (C₁₈, C₂₀, C₂₂ e C₂₄), na maioria das vezes, monoinsaturados. Outra vantagem desses óleos de sementes é que, como fonte de biodiesel, eles não irão competir com sementes comestíveis (ex.: soja, milho e girassol) ou sementes viáveis para qualquer outra aplicação tecnológica (ex.: linhaça e rícino).

4.2. AFLP

Nas Figuras 21-25 estão documentados os DNAs das várias populações analisadas, tanto de *V. pyramidalis* quanto de *V. tucanorum*. Como se pode verificar, algumas amostras não mostraram DNAs de boa qualidade, pois além de apresentarem bandas fracas, ainda mostraram degradação. Isso possivelmente se deve ao fato de que estas espécies possuem uma grande quantidade de substâncias fenólicas, que acabam prejudicando a extração, embora seja colocado no tampão de extração polivinilpirrolidona, que ajuda a retirar esses compostos fenólicos. A extração de DNA de *V. pyramidalis* foi mais difícil do que a de *V. tucanorum*, sendo que para se obter algum resultado foi necessário uma segunda extração.

As Figuras 26-28 documentam a quantificação dos DNAs extraídos. Os indivíduos de *V. tucanorum* apresentaram uma quantidade de DNA maior que os de *V. pyramidalis* (Tabelas 7 e 8). A maioria dos indivíduos de *V. pyramidalis* apresentaram valores entre 20-45 ng/mL, poucos chegando a 50 ng/mL (Tabela 7). Em *V. tucanorum* também não houve grande variação, mas os valores foram mais elevados. A grande maioria dos indivíduos de Bauru e do de IBGE-Brasília (DF) apresentaram valores menores entre 25-40 ng/mL. O restante das populações apresentou resultados melhores, ficando entre 50-80 ng/mL (Tabela 8). Apesar desse método de quantificação ser estimativo, se mostrou o mais eficaz, pois na quantificação por espectrofotômetro, as leituras são feitas entre 260 a 320 nm, comprimentos de onda absorvidos por substâncias fenólicas. Amostras, como as das espécies aqui estudadas, que apresentam muitos compostos fenólicos, teriam uma quantidade de DNA superestimada.

Devido às baixas quantidades de DNA nas folhas de *V. pyramidalis*, foram necessários vários testes com quantidades diferentes de DNA para a reação de digestão. As quantidades escolhidas ficaram entre 135ng e 160ng.

Exemplos de reação pré-seletiva do produto da reação de digestão-ligação do DNA de folhas de alguns indivíduos de *V. tucanorum* estão documentados na Figura 29.

Foram testadas várias combinações de iniciadores para se obter as combinações ideais para a realização das análises. Em *Vochysia tucanorum* foram testadas 18 combinações do Kit Regular da Applied Biosystems e em *Vochysia pyramidalis* foram testadas 29 combinações do Kit Regular da Applied Biosystems e 4 combinações do Kit Small da Applied Biosystems. Esse número alto de combinações testadas para *Vochysia pyramidalis* se deve ao fato de que não havia resposta de fragmentos polimórficos em número suficiente para uma análise bem estruturada. Finalmente, optou-se em utilizar o Kit Small da Applied Biosystems, que necessita de menores quantidades de DNA, com o qual se obteve melhores resultados na obtenção de fragmentos polimórficos com as combinações testadas.

Modificou-se também o “AFLP Plant Mapping Protocol” da Applied Biosystems para os indivíduos de *Vochysia pyramidalis*. Por exemplo, para a reação pré-seletiva, o produto da reação de ligação foi usado sem diluição, o mesmo acontecendo na reação seletiva, ao se utilizar o produto de reação pré-seletiva.

As Tabelas 9 e 10 apresentam a quantidade total de fragmentos obtidos com as melhores combinações de iniciadores e a quantidade dos fragmentos selecionados para *V. pyramidalis* e *V. tucanorum*, respectivamente. Uma vez que *V. pyramidalis* apresentou uma menor quantidade de fragmentos de restrição, não houve seleção com relação a eles, sendo utilizados todos os fragmentos obtidos (Tabela 9).

O mesmo não aconteceu em *V. tucanorum*, pois devido ao maior número de fragmentos obtidos, pode-se fazer uma seleção dos mais polimórficos (Tabela 10). Algumas exceções ocorreram, e nesses casos também não houve seleção de fragmentos: por exemplo, o indivíduo T6a (Perdões) e o indivíduo T4d (IBGE-Brasília) com a combinação ACG-CAA; o indivíduo T1c (Bauru), e o indivíduo T7a (Sengés) com a combinação AGG-CTG.

Como *V. pyramidalis* gerou poucos fragmentos, foram considerados os fragmentos a partir de 50 pb, enquanto para *V. tucanorum*, foram utilizados fragmentos a partir de 75 pb. Neste último caso, os fragmentos utilizados foram selecionados através da análise visual dos eletroferogramas de cada indivíduo levando em consideração o tamanho e a área do fragmento no eletroferograma.

Nas Figuras 30 e 31 estão documentados dois exemplos de eletroferogramas da reação de amplificação seletiva dos produtos de reação pré-seletiva do genoma de folhas de *V. pyramidalis*. Como se pode observar os fragmentos apresentam poucos pares de bases, saindo no início da corrida. Como já mencionado, foram selecionados os fragmentos a partir de 50 pb.

Nas Figuras 32 e 33 estão documentados dois exemplos de eletroferogramas da reação de amplificação seletiva dos produtos de reação pré-seletiva do genoma de folhas de *Vochysia tucanorum*. Nesse caso é possível observar um resultado bem mais significativo, com fragmentos de maior abundância, além de apresentarem uma sequência maior de pares de bases do que os de *V. pyramidalis*, demonstrando, dessa maneira, resultados polimórficos mais consistentes.

Na Figura 34, uma matriz binária de presença e ausência de fragmentos de restrição de *Vochysia pyramidalis* foi submetida à análise de ordenação com suas coordenadas principais (PCO). É possível observar alguns agrupamentos de indivíduos da mesma população. No Grupo 1 estão reunidos cinco indivíduos da população de Palmeiras (P3a, P3c, P3d, P3e e P3f); outros dois (P3b e P3g), juntamente com um indivíduo da UnB (P4g) estão muito próximos deste grupo. No Grupo 2 encontram-se dois indivíduos da população de Alto Paraíso de Goiás (P1b, P1c) e um indivíduo de Andaraí (P2d). No Grupo 3 aparecem três indivíduos da população da UnB-Brasília (P4b, P4e e P4h) e um de Andaraí (P2f); os outros dois indivíduos (P4a e P4i) ficaram próximos, formando o Grupo 4. No grupo 5 estão agrupados outros dois indivíduos da população de Andaraí (P2b e P2g); P2c e P2e se separaram muito deste agrupamento.

Na Figura 35, uma matriz binária de presença e ausência de fragmentos de restrição de *Vochysia pyramidalis* foi submetida à análise usando método de distância mínima Neighbor Joining e medida de distância de Nei & Li com índice de bootstrap com 1000 réplicas gerando o filograma por meio do software PAUP, versão 4.0 (Swofford, 2002). Os resultados obtidos no filograma mostram alguma semelhança com a análise de PCO (Fig. 34). Os dados obtidos permitiram a formação de dois grandes agrupamentos, A e B. O agrupamento A pode ser subdividido em outros dois: A1 e A2. No agrupamento A1 é encontrado um indivíduo da Chapada dos Veadeiros (P1c), dois de Andaraí (P2d e P2f) e um indivíduo de Palmeiras (P3h). O agrupamento A2 une grande parte dos indivíduos de Palmeiras (P3a, P3b, P3c, P3d, P3e, P3f e P3g), além de dois indivíduos de Andaraí (P2c e P2e) e um indivíduo da UnB (P4g). O agrupamento B também pode ser dividido em B1 e B2. O agrupamento B1 possui dois indivíduos de Andaraí (P2b e P2g) e um indivíduo da UnB (P4i). B2 agrupa dois indivíduos da UnB (P4a e P4d). Os outros três indivíduos P4b, P4e e P4h da UnB ficaram distantes dos outros indivíduos da população. O indivíduo da Chapada dos Veadeiros, P1b, se separou de todas as outras populações, o mesmo acontecendo na análise de agrupamento com os dados da distribuição de ácidos graxos (Fig. 16). Isto demonstra que esse indivíduo é diferente, tanto fitoquímica quanto molecularmente dos demais. Embora tendo seus frutos muito semelhantes aos demais da espécie, não foram coletadas flores que comprovassem sua identidade. Os índices de bootstrap, muito baixos, estão de acordo com o pequeno número de diferenças entre as amostras. Em um estudo sistemático em *Eucalyptus* utilizando marcadores AFLP, os valores de índice de bootstrap também não sustentaram os ramos, apenas 10% da variação genética separou o principal grupo de espécie e 7% residiu entre as espécies dentro dos grupos (McKinnon *et al.*, 2008).

Na Figura 36, uma matriz binária de presença e ausência de fragmentos de restrição de *Vochysia tucanorum* foi submetida à análise de ordenação com suas coordenadas principais (PCO). O resultado dessa análise mostra que os pontos correspondentes aos indivíduos não obedecem a nenhum padrão, estando dispostos ao acaso, com as populações totalmente misturadas entre si. Por isso, a tendência é acreditar que os indivíduos são todos geneticamente parecidos, embora pertencendo a populações diferentes.

Pode-se notar a mesma distribuição caótica de indivíduos de populações diferentes na Figura 37 que corresponde ao resultado da análise usando método de distância mínima Neighbor Joining e medida de distância de Nei & Li com índice de bootstrap com 1000 réplicas gerando o filograma através do software PAUP, versão 4.0 (Swofford, 2002). Apesar da maioria dos indivíduos formarem dois agrupamentos, A e B, em cada um deles há uma mistura de populações diferentes. Entretanto, as populações T6 de Perdões (T6b, T6c e T6e) e T7 de Sengés (T7a, T7b, T7f, T7g e T7h) se mantiveram no grupamento B, enquanto a maior parte dos indivíduos da população de Bauru (T1c, T1d, T1e e T1g) se agruparam em A. Como na análise anterior, os índices de bootstrap foram muito baixos, não havendo sustentação nos ramos que comprove alguma diferença significativa entre eles. Essa semelhança entre as populações foi também observada na análise fitoquímica, com ácidos graxos de cadeias longas (acima de 18 átomos de carbono) e geralmente monoinsaturados (Tabela 6). Apenas alguns indivíduos da população T7 (Sengés) mostram uma separação na análise fitoquímica de ordenação e agrupamento (Figuras 17 e 18) formando um grupo devido à presença de ácido mirístico ($C_{14:0}$). Como mencionado, na análise molecular não foi encontrada diferenças genéticas entre os indivíduos das populações, sendo eles extremamente parecidos, mesmo oriundos de localidades geograficamente distantes.

As características morfológicas fundamentais para diferenciar a família Vochysiaceae estão concentradas nas suas partes florais. Notou-se inicialmente uma redução no número de pétalas durante o processo evolutivo, seguida da posição do estame fértil que define os gêneros; este está correlacionado com o número de pétalas. Em *Vochysia*, as flores possuem três pétalas e o estame fértil posicionado em frente a uma delas. Litt & Stevenson (2003) mostraram que existe pouca variabilidade entre as espécies de *Vochysia*. Parece que isso também é refletido nas características fitoquímicas e moleculares estudadas no presente trabalho, que também apresentaram pouca variação.

A floresta Amazônica e a mata Atlântica são muito mais antigas que o cerrado e acredita-se que foram as principais fontes de especiação das plantas do cerrado. Existem duas hipóteses para a evolução de Vochysiaceae. Vários estudos mostram que as espécies de *Vochysia* tendem a ter uma redução no número de pétalas, sendo, portanto, derivadas de *Salvertia*.

Existe, entretanto, outra hipótese que revela que *Salvertia* se originou de *Vochysia* de florestas tropicais, e as cinco pétalas de *Salvertia* foram mantidas devido ao sistema de polinização por mariposas. A perda de duas ou quatro pétalas de *Vochysia*, originando os outros gêneros da família, foi devido ao forte sistema de polinização pelas abelhas. Na família, a redução da corola a uma pétala única e larga parece representar o estágio final de evolução (Gottsberger *et al.*, 2006).

Segundo estudos recentes, a polinização de *Vochysia* pode ser anemófila ou realizada por abelhas, beija-flores e mariposas de hábito diurno. Os beija-flores comumente observados em torno de Brasília e Uberlândia são relativamente grandes espécies de *Amazilia* e *Colibri*. Em São Paulo, as espécies do gênero estão distribuídas em populações mais abertas, quando comparadas com a sua distribuição na região central de cerrado. Isso significa que nas populações de São Paulo existe maior distância entre indivíduos, do que no cerrado. Mesmo assim, o crescimento de *Vochysia cinnamomea* nos cerrados de Botucatu (SP) tem um tipo de polinizadores praticamente igual ao de Uberlândia (MG) (Gottsberger *et al.*, 2006). Um estudo realizado no Jardim Botânico de Brasília demonstrou que as flores de *Vochysia tucanorum* são polinizadas por abelhas menores e pela mariposa diurna *Aellipus fadus*. Oliveira & Gibbs (1994) constataram que *Vochysia pyramidalis* é polinizada pela mesma mariposa e pelas grandes abelhas *Eulaema nigrita* e *Bombus* sp..

Vochysiaceae apresenta uma grande capacidade de dispersão. Em um estudo biogeográfico e histórico da família, Systma *et al.* (2004) constataram que o gênero africano *Erismadelphus* e seu irmão americano *Erisma* foram separados a 28 milhões de anos, próximo ao final do Oligoceno, muito depois da completa separação da América do Sul e do oeste da África, mostrando sua capacidade de dispersão a longas distâncias sobre uma considerável barreira de água. Além disso, o fruto da espécie *Erisma calcaratum* que vive em florestas inundadas da Amazônia sofreu modificações durante o processo de evolução e seu formato lembra a estrutura de uma rolha facilmente dispersada pela água.

Espécies perenes de árvores tropicais tendem a exibir altos níveis de diversidade na população e baixos níveis de diferenciação entre elas. Além disso, espécies com alta

capacidade de dispersão, tanto do pólen quanto das sementes, mantêm uma grande conectividade entre as populações (Cavers *et al.*, 2005).

Estudos teóricos têm mostrado que os ciclos de colonização/extinção trazem consequências complexas para a estrutura genética e, estes ciclos, podem resultar em uma redução na diferenciação entre as populações. O esclarecimento da estrutura genética em algumas espécies pode ser mais difícil devido à marca impressa de um longo processo histórico, particularmente em regiões onde existam barreiras topográficas e ambientais (Cavers *et al.*, 2005).

Os dados originados neste trabalho sugerem que as populações, tanto de *Vochysia pyramidalis* quanto de *Vochysia tucanorum*, estão coerentes com a interpretação de Cavers *et al.* (2005), relativa a um fluxo gênico intenso (provavelmente mediado principalmente pelo pólen) em *V. ferruginea*. Isso explicaria a pequena distância genética entre as populações, sugerida pelos marcadores AFLP e refletida na distribuição de ácidos graxos.

Por meio dos trabalhos encontrados na literatura (citados acima) e dos dados provenientes da análise dos ácidos graxos de sementes e dos dados moleculares obtidos por AFLP, pode-se sugerir que tanto *V. pyramidalis* quanto *V. tucanorum* apresentaram uma divergência muito recente, com predominância ainda de uma linhagem ancestral, havendo, portanto, baixas taxas de polimorfismos entre as populações, que possuem um fluxo gênico contínuo. Entretanto, pelos dados aqui apresentados, as espécies estão muito bem estabelecidas.

5. TABELAS E FIGURAS

Tabela 3. Teores de óleo (%), obtidos a partir do peso seco das sementes de *Vochysia pyramidalis*, das várias populações coletadas. Os números abaixo dos locais de coleta correspondem aos indivíduos.

LOCALIDADE / AMOSTRA	% ÓLEO	LOCALIDADE / AMOSTRA	% ÓLEO
Palmeiras (BA)		UnB - Brasília (DF)	
P3a	15,78	P4a	9,24
P3b	14,37	P4b	15,02
P3c	3,64	P4c	23,58
P3d	6,98	P4d	9,27
P3e	17,02	P4e	16,14
P3f	3,35	P4f	17,13
P3g	10,08	P4g	14,89
P3h	12,92	P4h	6,13
P3i	14,50	P4i	5,38
10,96 ± 5,20		12,97 ± 5,91	
Andaraí (BA)		Alto Paraíso de Goiás (GO)	
P2a	13,63	P1a	1,84
P2b	14,06	P1b	1,37
P2c	11,29	P1c	8,18
P2d	9,85	3,80 ± 3,81	
P2e	15,43		
P2f	12,15		
P2g	21,54		
P2h	11,73		
13,71 ± 3,61			

Tabela 4. Teores de óleo (%), obtidos a partir do peso seco das sementes de *Vochysia tucanorum*, das várias populações coletadas. Os números abaixo dos locais de coleta correspondem aos indivíduos.

LOCALIDADE AMOSTRA	% ÓLEO	LOCALIDADE AMOSTRA	% ÓLEO	LOCALIDADE AMOSTRA	% ÓLEO
Sengés (PR)		Bauru (SP)		Botucatu (SP)	
T7a	3,48	T1a	17,68	T2a	20,42
T7b	11,54	T1b	32,26	T2b	21,64
T7c	10,16	T1c	12,78	T2c	22,64
T7d	9,59	T1d	32,88	T2d	19,73
T7e	8,17	T1e	27,55	T2e	18,09
T7f	2,66	T1f	30,69	T2f	14,59
T7g	3,05	T1g	28,82		19,52 ± 2,88
T7h	3,16		26,09 ± 7,78		
6,48 ± 3,74					
Santana do Riacho		Perdões (MG)		Brasília (DF)	
T3a	17,80	T6a	26,26	T4a	18,64
T3b	20,20	T6b	18,35	T4b	18,52
T3c	20,15	T6c	25,73	T4c	20,74
T3d	15,72	T6d	18,39	T4d	19,96
T3e	18,65	T6e	20,70	T4e	21,11
	18,50 ± 1,86	T6f	20,57	T4f	15,85
			21,67 ± 3,51	T4g	16,73
				T4h	21,16
				T4i	24,45
				T4j	18,24
					19,54 ± 2,49
		Ibicoara (BA)			
		T5a	20,04		
		T5b	20,10		
		T5c	16,34		
		T5d	17,52		
		T5e	20,65		
		T5f	8,81		
		T5g	16,73		
		T5h	14,46		
		T5i	15,45		
		T5j	14,90		
			16,50 ± 3,51		

Tabela 5 - Abundâncias relativas (%) dos ácidos graxos dos óleos de sementes de *Vochysia pyramidalis*. Os números abaixo das localidades correspondem aos indivíduos daquela população.

Localidade	Distribuição dos ácidos graxos (%)													
	C _{12:0}	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	C _{20:0}	C _{20:1}	C _{22:0}	C _{22:1}	C _{24:0}	C _{24:1}	Outros
Andaraí (BA)														
P2a	-	-	8,2	35	45,2	3,3	-	6,2	0,7	1,4	-	-	-	-
P2b	-	-	9,3	30,5	48	3,7	-	6,1	0,8	1,6	-	-	-	-
P2c	-	-	7,9	27,9	53,1	4,2	-	4,7	0,7	1,5	-	-	-	-
P2d	-	-	8,3	30,3	48,3	4,6	-	6	0,7	1,8	-	-	-	-
P2e	-	-	8,7	30	48,4	3,8	-	6,5	0,8	1,8	-	-	-	-
P2f	-	-	8,3	27,6	51,2	4,7	-	5,7	0,7	1,8	-	-	-	-
P2g	-	-	9,7	32,5	44,9	4,2	-	6,3	1	1,4	-	-	-	-
P2h	-	-	8,1	25,8	53,3	3,7	-	6,2	1,1	1,8	-	-	-	-
Palmeiras (BA)														
P3a	-	-	9,2	29,4	45,3	3,8	-	7,1	1,2	2	-	-	0,9	1,1
P3b	-	-	9,2	25,8	48,4	4,1	-	6,3	1	1,9	-	-	2,4	0,9
P3c	1,7	1,3	10,2	14,9	38,4	6,6	-	5,5	1,5	2,8	-	-	2,4	14,7
P3d	-	0,9	11,4	23,3	46	5,9	-	5,6	1	2	-	-	-	3,9
P3e	-		9,3	29,2	46,3	4	-	7,3	1,4	1,9	-	-	-	0,6
P3f	-	1,1	10	17	42	8,4	-	5,7	3,3	2,9	1,7	-	-	7,9
P3g	-	0,3	9	24,6	48,3	4,8	-	6,4	1,1	1,9	-	-	-	3,6
P3h	-	-	10,6	25,9	47,4	4,9	-	6,1	1,2	1,8	-	-	-	2,1
P3i	-	-	10	28,8	43,4	4,8	-	6,4	1,4	1,8	-	-	-	3,4

Tabela 5. (Continuação).

Localidade	Distribuição dos ácidos graxos (%)													
	C _{12:0}	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	C _{20:0}	C _{20:1}	C _{22:0}	C _{22:1}	C _{24:0}	C _{24:1}	Outros
UnB-Brasília (DF)														
P4a	-	-	9	28,1	47,7	6,4	-	6,1	1	1,7	-	-	-	-
P4b	-	-	9,6	29,4	47,4	5,6	-	5,8	0,8	1,4	-	-	-	-
P4c	-	-	9,3	30,8	47	4,2	-	6	0,9	1,5	-	-	-	0,3
P4d	-	-	8,8	26,4	47,9	7,2	-	6,5	1,2	2	-	-	-	-
P4e	-	-	9,3	26,2	50,4	5	-	6,3	1	1,8	-	-	-	-
P4f	-	-	7,4	30,3	47,6	5,8	-	6,2	0,9	1,8	-	-	-	-
P4g	-	-	9,3	30,6	47	4,7	-	6	0,9	1,5	-	-	-	-
P4h	-	-	9,7	30	45	5,2	-	5,3	1	1,3	-	-	-	2,5
P4i	-	0,8	10,1	22,7	46,6	7,5	-	4,8	0,9	1,7	-	-	-	4,9
Alto Paraíso de Goiás (GO)														
P1a	0,8	3,2	17,7	4,5	5,7	19,6	7	1,1	1,6	1,1	1	-	-	36,7
P1b	1,7	2,7	12,9	3,6	11,7	12,7	1,6	1,3	4,9	1,8	2,8	-	-	42,3
P1c	-	-	9,1	15,4	43,4	9	4	5,3	1,2	2,5	-	4,4	1,2	4,5

Tabela 6. Abundâncias relativas (%) dos ácidos graxos dos óleos de sementes de *Vochysia tucanorum*. Os números abaixo das localidades correspondem aos indivíduos daquela população.

Localidade	Distribuição dos ácidos graxos (%)													
	C _{10:0}	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	C _{20:0}	C _{20:1}	C _{22:0}	C _{22:1}	C _{24:0}	C _{24:1}	Outros
Sengés (PR)														
T7a	-	0,4	5,2	1,3	26,7	28,4	1,7	1,7	17,2	5,5	10,3	1,6	-	-
T7b	-	-	2,2	0,9	23,8	19,2	0,8	2,0	26,6	6,0	16,4	0,9	0,8	0,4
T7c	-	0,7	4,6	1,5	27,8	1,1	0,8	2,8	25,7	7,7	15,0	1,2	-	11,1
T7d	-	-	3,2	1,0	16,3	29,1	1,2	1,8	21,1	6,5	17,2	1,2	1,0	0,4
T7e	-	0,4	6,4	1,6	21,4	32,5	2,0	1,9	15,3	5,8	11,2	1,5	-	-
T7f	-	1,0	6,2	1,6	21,5	35,7	2,0	2,0	14,2	5,0	9,1	1,7	-	-
T7g	-	0,9	5,2	1,4	15,9	30,2	1,6	1,9	19,7	6,6	15,1	1,5	-	-
T7h	-	-	5,2	1,5	17,8	33,0	1,7	2,6	18,0	6,4	12,3	1,5	-	-
Bauru (SP)														
T1a	-	-	2,2	0,8	19,4	13,5	0,3	2,0	28,3	7,2	23,4	1,3	1,4	0,2
T1b	-	-	3,2	0,9	19,8	13,4	-	2,4	29,8	7,7	20,8	1,1	0,9	-
T1c	-	-	2,6	1,1	19,5	16,4	-	2,5	26,9	8,4	19,9	1,5	1,2	-
T1d	-	-	2,3	0,8	16,8	16,8	-	2,1	28,6	7,3	22,8	1,2	1,3	-
T1e	-	-	3,1	0,9	19,5	15,1	-	2,0	28,8	7,3	20,8	1,3	1,2	-
T1f	-	-	2,5	0,9	18,0	13,4	-	2,4	29,4	8,1	23,0	1,2	1,1	-
T1g	-	-	2,7	0,9	19,8	12,9	-	2,1	28,3	7,7	22,7	1,5	1,4	-

Tabela 6. (Continuação).

Localidade	Distribuição dos ácidos graxos (%)													
	C _{10:0}	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	C _{20:0}	C _{20:1}	C _{22:0}	C _{22:1}	C _{24:0}	C _{24:1}	Outros
Botucatu (SP)														
T2a	-	-	1,8	0,7	16,6	17,1	0,4	1,8	28,5	6,6	23,9	1,2	1,4	-
T2b	-	-	1,9	0,7	17,3	17,6	0,4	1,9	28,0	7,1	22,4	1,3	1,4	-
T2c	-	-	1,6	0,6	19,3	15,3	-	2,2	30,3	6,9	21,6	1,1	1,1	-
T2d	-	-	1,5	0,6	17,0	16,6	0,4	1,8	29,2	6,9	23,6	1,2	1,2	-
T2e	-	-	1,5	0,8	20,4	13,6	-	2,3	29,5	8,1	21,4	1,3	1,1	-
T2f	-	-	1,7	0,7	18,4	15,4	-	2,0	28,7	7,8	22,5	1,4	1,4	-
Santana do Riacho (MG)														
T3a	-	1,5	1,7	0,8	20,3	12,9	-	2,0	27,2	7,4	23,5	1,3	1,4	-
T3b	0,6	-	1,7	0,7	16,6	16,0	-	1,5	26,9	7,1	24,9	1,4	1,5	1,1
T3c	-	-	1,7	0,8	15,8	16,3	0,4	1,9	27,7	7,2	25,4	1,3	1,5	-
T3d	-	-	1,9	0,8	16,3	16,3	0,4	2,0	27,5	7,1	24,9	1,3	1,5	-
T3e	-	-	1,9	0,6	17,4	15,3	0,4	1,4	26,2	6,6	26,7	1,5	2,0	-
Perdões (MG)														
T6a	-	-	1,7	0,7	22,8	9,7	0,3	1,9	31,2	7,1	22,4	1,1	1,1	-
T6b	-	-	2,0	0,9	24,0	9,3	0,4	2,1	29,2	7,6	22,0	1,3	1,2	-
T6c	-	-	2,0	0,7	19,7	12,9	0,3	1,8	30,7	6,7	22,9	1,1	1,2	-
T6d	-	-	2,1	0,7	23,5	10,1	0,4	1,7	30,2	6,1	23,0	1,0	1,2	-
T6e	-	-	2,2	0,7	24,4	9,8	0,3	1,7	30,9	6,0	22,0	0,9	1,1	-

Tabela 6. (Continuação).

Localidade	Distribuição dos ácidos graxos (%)													
	C _{10:0}	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	C _{20:0}	C _{20:1}	C _{22:0}	C _{22:1}	C _{24:0}	C _{24:1}	Outros
Perdões (MG)														
T6f	-	-	1,4	0,6	19,6	12,3	0,3	1,8	29,9	6,3	25,3	1,1	1,4	-
IBGE-Brasília (DF)														
T4a	-	-	2,3	0,7	19,1	14,7	0,4	1,8	28,7	6,3	23,6	1,1	1,3	-
T4b	-	-	2,1	0,7	19,2	14,1	0,3	1,9	29,5	6,7	23,1	1,1	1,3	-
T4c	-	-	2,0	0,7	19,2	13,7	0,2	1,6	29,4	6,5	24,0	1,2	1,5	-
T4d	-	-	1,9	0,6	16,9	15,5	0,4	1,5	29,0	6,8	24,6	1,3	1,5	-
T4e	-	-	1,8	0,6	17,5	14,4	0,3	1,8	30,1	6,8	24,1	1,3	1,3	-
T4f	-	-	2,6	0,7	19,3	15,6	0,3	1,8	26,3	6,9	23,5	1,4	1,6	-
T4g	-	-	1,5	0,6	20,9	13,4	0,5	1,9	28,2	6,9	23,1	1,4	1,6	-
T4h	-	-	1,9	0,8	20,2	13,9	0,5	1,6	27,7	6,8	23,6	1,4	1,6	-
T4i	-	-	1,8	0,8	17,1	15,4	0,4	2,1	29,2	7,5	23,3	1,2	1,2	-
T4j	-	-	1,9	0,9	19,3	14,2	0,4	1,8	29,1	6,9	22,9	1,3	1,3	-
Ibicoara (BA)														
T5a	-	-	2,8	0,9	21,5	12,8	0,4	1,7	28,4	6,5	22,4	1,3	1,3	-
T5b	-	-	2,7	0,9	23,5	12,9	0,4	1,9	29,3	6,7	19,6	1,1	1,0	-
T5c	-	-	3,3	1,1	24,5	12,0	0,4	1,9	28,2	6,9	19,3	1,3	1,1	-
T5d	-	-	2,8	1,0	24,7	12,1	0,5	1,9	28,9	6,5	19,4	1,2	1,0	-
T5e	-	-	2,7	1,0	23,5	11,6	0,4	1,8	29,4	6,4	21,0	1,1	1,1	-

Tabela 6. (Continuação).

Localidade	Distribuição dos ácidos graxos (%)													
	C _{10:0}	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	C _{20:0}	C _{20:1}	C _{22:0}	C _{22:1}	C _{24:0}	C _{24:1}	Outros
Ibicoara (BA)														
T5f	-	-	5,4	1,9	40,5	13,0	0,9	1,8	21,4	4,5	9,2	0,8	0,4	0,2
T5g	-	-	3,1	1,0	24,6	12,3	0,4	1,8	27,9	6,4	20,2	1,2	1,1	-
T5h	-	-	4,4	1,4	34,4	10,5	0,6	1,8	25,4	5,7	14,1	1,0	0,7	-
T5i	-	-	2,4	1,0	25,3	10,5	0,4	1,9	29,3	6,6	20,3	1,2	1,1	-
T5j	-	-	3,0	1,0	25,8	11,3	0,5	2,0	28,8	6,5	18,9	1,2	1,0	-

Tabela 7. Quantificação dos DNAs extraídos dos indivíduos de *Vochysia pyramidalis* de todas as populações estudadas.

<i>Vochysia pyramidalis</i>			
Localidade/Indivíduo	DNA (ng/mL)	Localidade/Indivíduo	DNA (ng/mL)
Andaraí (BA)		Alto Paraíso de Goiás (GO)	
P2a	45	P1a	30
P2b	40	P1b	40
P2c	40	P1c	30
P2d	45		
P2e	50		
P2f	40		
P2g	30		
P2h	45		
Palmeiras (BA)		UnB - Brasília (DF)	
P3a	40	P4a	40
P3b	30	P4b	50
P3c	45	P4c	35
P3d	40	P4d	50
P3e	35	P4e	40
P3f	45	P4f	40
P3g	20	P4g	30
P3h	45	P4h	35
P3i	45	P4i	35

Tabela 8. Quantificação dos DNAs extraídos dos indivíduos de *Vochysia tucanorum* de todas as populações estudadas.

<i>Vochysia tucanorum</i>			
Localidade/Indivíduo	DNA (ng/mL)	Localidade/Indivíduo	DNA (ng/mL)
Bauru (SP)		Botucatu (SP)	
T1a	20	T2a	30
T1c	25	T2b	70
T1d	35	T2c	50
T1e	50	T2d	75
T1f	25	T2e	80
T1g	25		
Perdões (MG)		Santana do Riacho (MG)	
T6a	70	T3a	55
T6b	70	T3b	50
T6c	55	T3c	65
T6d	50	T3d	60
T6e	75	T3e	65
T6f	50		
Ibicoara (BA)		IBGE - Brasília (DF)	
T5a	55	T4a	65
T5b	70	T4b	70
T5c	50	T4c	65
T5d	60	T4d	50
T5e	70	T4e	55
T5f	50	T4f	40
T5g	60	T4g	30
T5h	50	T4h	25
T5i	55	T4i	30
T5j	50	T4j	40
Sengés (PR)			
	T7a	50	
	T7b	55	
	T7c	50	
	T7d	50	
	T7e	50	
	T7f	50	
	T7g	50	
	T7h	70	

Tabela 9. Quantidade de fragmentos encontrados e selecionados das melhores combinações de iniciadores em *Vochysia pyramidalis*.

<i>Vochysia pyramidalis</i>			
Combinação AC-CTG			
Localidade/Indivíduo	Total e selecionados	Localidade/Indivíduo	Total e selecionados
Andaraí (BA)		Alto Paraíso de Goiás (GO)	
P2a	7	P1a	8
P2b	9	P1b	2
P2c	25	P1c	8
P2d	14		
P2e	13		
P2f	11		
P2g	5		
P2h	13		
Palmeiras (BA)		Unb - Brasília (DF)	
P3a	25	P4a	6
P3b	20	P4b	11
P3c	30	P4c	11
P3d	25	P4d	22
P3e	21	P4e	14
P3f	27	P4f	4
P3g	35	P4g	17
P3h	13	P4h	6
P3i	12	P4i	13
Combinação AC-CAT			
Localidade/Indivíduo	Total e selecionados	Localidade/Indivíduo	Total e selecionados
Andaraí (BA)		Alto Paraíso de Goiás (GO)	
P2a	0	P1a	0
P2b	4	P1b	12
P2c	22	P1c	8
P2d	12		
P2e	21		
P2f	18		
P2g	7		
P2h	15		
Palmeiras (BA)		Unb - Brasília (DF)	
P3a	11	P4a	2
P3b	34	P4b	4
P3c	20	P4c	10
P3d	13	P4d	4
P3e	2	P4e	3
P3f	20	P4f	7
P3g	40	P4g	34
P3h	17	P4h	7
P3i	5	P4i	12

Tabela 9. (Continuação).

Combinação AC-CTA			
Localidade/Indivíduo	Total e selecionados	Localidade/Indivíduo	Total e selecionados
Andaraí (BA)		Alto Paraíso de Goiás (GO)	
P2a	1	P1a	10
P2b	5	P1b	5
P2c	6	P1c	6
P2d	8		
P2e	6		
P2f	8		
P2g	8		
P2h	0		
Palmeiras (BA)		Unb - Brasília (DF)	
P3a	8	P4a	1
P3b	10	P4b	2
P3c	9	P4c	0
P3d	7	P4d	1
P3e	17	P4e	1
P3f	9	P4f	4
P3g	16	P4g	3
P3h	2	P4h	4
P3i	7	P4i	1

Tabela 10. Quantidade de fragmentos encontrados e selecionados das melhores combinações de iniciadores de *Vochysia tucanorum*.

<i>Vochysia tucanorum</i>					
Combinação ACG-CAA					
Localidade/Indivíduo	Total	Selecionados	Localidade/Indivíduo	Total	Selecionados
Bauru (SP)			Botucatu (SP)		
T1a	50	11	T2a	16	7
T1c	44	10	T2b	69	8
T1d	48	6	T2c	56	6
T1e	44	5	T2d	66	12
T1f	41	4	T2e	111	14
T1g	19	3			
Perdões (MG)			Santana do Riacho (MG)		
T6a	7	2	T3a	31	12
T6b	69	8	T3c	72	6
T6c	35	8	T3e	69	4
T6e	66	3			
Ibicoara (BA)			IBGE - Brasília (DF)		
T5a	29	9	T4a	61	8
T5b	67	2	T4b	44	12
T5c	46	5	T4c	68	11
T5d	94	14	T4d	8	3
T5f	21	8	T4e	25	4
Sengés (PR)					
Localidade/Indivíduo		Total	Selecionados		
T7a		10	6		
T7b		82	9		
T7c		19	4		
T7f		29	4		
T7g		103	12		
T7h		100	7		

Tabela 10. (Continuação).

Combinação AGG-CTG

Localidade/Indivíduo	Total	Selecionados	Localidade/Indivíduo	Total	Selecionados
Bauru (SP)			Botucatu (SP)		
T1a	43	18	T2a	0	0
T1c	8	2	T2b	29	12
T1d	15	6	T2c	40	3
T1e	65	6	T2d	18	10
T1f	61	13	T2e	42	18
T1g	19	6			
Perdões (MG)			Santana do Riacho (MG)		
T6a	11	5	T3a	14	3
T6b	66	10	T3c	22	12
T6c	57	12	T3e	63	28
T6e	86	14			
Ibicoara (BA)			IBGE - Brasília (DF)		
T5a	37	9	T4a	34	3
T5b	98	5	T4b	31	13
T5c	58	20	T4c	53	4
T5d	18	9	T4d	17	7
T5f	44	17	T4e	10	4
Sengés (PR)					
Localidade/Indivíduo	Total		Selecionados		
T7a	8		4		
T7b	12		5		
T7c	13		9		
T7f	68		20		
T7g	53		8		
T7h	45		8		

Tabela 10. (Continuação).

Combinação ACT-CAA

Localidade/Indivíduo	Total	Selecionados	Localidade/Indivíduo	Total	Selecionados
Bauru (SP)			Botucatu (SP)		
T1a	35	18	T2a	41	16
T1c	16	11	T2b	22	9
T1d	11	8	T2c	14	8
T1e	25	14	T2d	40	21
T1f	53	23	T2e	19	14
T1g	3	3			
Perdões (MG)			Santana do Riacho (MG)		
T6a	7	4	T3a	13	8
T6b	52	24	T3c	15	9
T6c	69	27	T3e	22	16
T6e	58	23			
Ibicoara (BA)			IBGE - Brasília (DF)		
T5a	20	15	T4a	20	16
T5b	17	9	T4b	37	17
T5c	13	9	T4c	53	30
T5d	24	17	T4d	7	7
T5f	14	12	T4e	17	12
Sengés (PR)					
Localidade/Indivíduo		Total		Selecionados	
T7a		12		11	
T7b		45		21	
T7c		23		13	
T7f		33		17	
T7g		64		26	
T7h		43		22	

Tabela 10. (Continuação).

Combinação ACA-CTG

Localidade/Indivíduo	Total	Selecionados	Localidade/Indivíduo	Total	Selecionados
Bauru (SP)			Botucatu (SP)		
T1a	33	20	T2a	44	17
T1c	10	8	T2b	8	5
T1d	16	11	T2c	7	4
T1e	17	13	T2d	19	9
T1f	46	24	T2e	43	25
T1g	7	5			
Perdões (MG)			Santana do Riacho (MG)		
T6a	26	21	T3a	24	15
T6b	50	25	T3c	18	13
T6c	19	15	T3e	33	21
T6e	20	19			
Ibicoara (BA)			IBGE - Brasília (DF)		
T5a	29	25	T4a	29	18
T5b	19	13	T4b	33	29
T5c	19	15	T4c	37	32
T5d	15	12	T4d	0	0
T5f	14	11	T4e	21	16
Sengés (PR)					
Localidade/Indivíduo			Total		Selecionados
T7a			34		23
T7b			18		15
T7c			5		5
T7f			49		24
T7g			39		26
T7h			36		16

Figura 4. Cromatograma dos ácidos graxos do óleo do indivíduo P2a de *Vochysia pyramidalis* da população de Andaraí (BA).

Figura 5. Cromatograma dos ácidos graxos do óleo do indivíduo P3a de *Vochysia pyramidalis* da população de Palmeiras (BA).

Figura 6. Cromatograma dos ácidos graxos do óleo do indivíduo P4a de *Vochysia pyramidalis* da população da UnB-Brasília (DF).

Figura 7. Cromatograma dos ácidos graxos do óleo do indivíduo P1c de *Vochysia pyramidalis* da população de Alto Paraíso de Goiás (GO).

Figura 8. Cromatograma dos ácidos graxos do óleo do indivíduo T2a de *Vochysia tucanorum* da população de Botucatu (SP).

Figura 9. Cromatograma dos ácidos graxos do óleo do indivíduo T4a de *Vochysia tucanorum* da população do IBGE-Brasília (DF).

Figura 10. Cromatograma dos ácidos graxos do óleo do indivíduo T5a de *Vochysia tucanorum* da população de Ibicoara (BA).

Figura 11. Cromatograma dos ácidos graxos do óleo do indivíduo T6a de *Vochysia tucanorum* da população de Perdões (MG).

Figura 12. Cromatograma dos ácidos graxos do óleo do indivíduo T7a de *Vochysia tucanorum* da população de Sengés (PR).

Figura 13. Cromatograma dos ácidos graxos do óleo do indivíduo T1a de *Vochysia tucanorum* da população de Bauru (SP).

Figura 14. Cromatograma dos ácidos graxos do óleo do indivíduo T3a de *Vochysia tucanorum* da população de Santana do Riacho (MG).

Figura 15. Análise de componente principal (PCA) referente aos homólogos de ácidos graxos dos indivíduos de *Vochysia pyramidalis* (P1-População de Alto Paraíso de Goiás (GO); P2-População de Andaraí (BA); P3- População de Palmeiras (BA) e P4- População da UnB-Brasília (DF)). As letras correspondem aos indivíduos das populações.

Figura 16. Dendrograma de afinidades entre os indivíduos de *Vochysia pyramidalis* baseado na distribuição de ácidos graxos determinada pelo coeficiente de Distância Euclidiana Simples com o método de agrupamento UPGMA (P1-População de Alto Paraíso de Goiás (GO); P2-População de Andaraí (BA); P3-População de Palmeiras (BA); P4-População da UnB-Brasília (DF). As letras correspondem aos indivíduos das populações.

Figura 17. Análise de componente principal (PCA) referente aos homólogos de ácidos graxos dos indivíduos de *Vochysia tucanorum* (T1-População de Bauru (SP); T2-População de Botucatu (SP); T3-População de Santana do Riacho (MG); T4-População do IBGE-Brasília (DF); T5-População de Ibicoara (BA); T6-População de Perdões (MG) e T7-População de Sengés (PR)). As letras correspondem aos indivíduos das populações.

Figura 18. Dendrograma de afinidades entre os indivíduos de *Vochysia tucanorum* baseado na distribuição de ácidos graxos determinada pelo coeficiente de Distância Euclidiana Simples com o método de agrupamento UPGMA (T1-População de Bauru (SP); T2-População de Botucatu (SP); T3-População de Santana do Riacho (MG); T4-População do IBGE-Brasília (DF); T5-População de Ibicoara (BA); T6-População de Perdões (MG) e T7-População de Sengés (PR)). As letras correspondem aos indivíduos das populações.

Figura 19. Análise de componente principal (PCA) referente aos homólogos de ácidos graxos dos indivíduos de *Vochysia tucanorum* (T1-População de Bauru (SP); T2-População de Botucatu (SP); T3-População de Santana do Riacho (MG); T4-População do IBGE-Brasília (DF); T5-População de Ibicoara (BA); T6-População de Perdões (MG) e T7-População de Sengés (PR) e de *Vochysia pyramidalis* (P1-População de Alto Paraíso de Goiás (GO); P2-População de Andaraí (BA); P3-População de Palmeiras (BA); P4-População da UnB-Brasília (DF)). As letras correspondem aos indivíduos das populações.

Figura 20. Dendrograma de afinidades entre os indivíduos de *Vochysia tucanorum* (T1-População de Bauru (SP); T2-População de Botucatu (SP); T3-População de Santana do Riacho (MG); T4-População do IBGE-Brasília (DF); T5-População de Ibicoara (BA); T6-População de Perdões (MG) e T7-População de Sengés (PR) e de *Vochysia pyramidalis* (P1-População de Alto Paraíso de Goiás (GO); P2-População de Andaraí (BA); P3-População de Palmeiras (BA); P4-População da UnB-Brasília (DF)) baseado na distribuição de ácidos graxos determinadas pelo coeficiente de Distância Euclidiana Simples com o método de agrupamento UPGMA. As letras correspondem aos indivíduos das populações.

Figura 21. Eletroforese em gel de agarose 1% do DNA total de folhas de *Vochysia tucanorum*. 1^a Sequência: indivíduos T7a-T7h da população do município de Sengés (PR); 2^a Sequência: indivíduos T3a-T3e da população de Santana do Riacho (MG).

Figura 22. Eletroforese em gel de agarose 1% do DNA total de folhas de *Vochysia tucanorum*. 1^a Sequência: indivíduos T5a-T5e da população do município de Ibicoara-BA; 2^a Sequência: indivíduos T5f-T5j da mesma população anterior, usando como marcadores "1 Kb DNA Ladder" (Lad.) (Gibco BRL).

Figura 23. Eletroforese em gel de agarose 1% do DNA total de folhas de *Vochysia tucanorum*. 1ª Sequência : T1b, T1d da população do município de Bauru (SP); T6a, T6b, T6e da população do município de Perdões (MG); T2b da população de Botucatu (SP). 2ª Sequência: T2d, T2e, T2f da população do município de Botucatu (SP); T3a, T3b, T3e da população de Santana do Riacho (MG), usando como marcadores “1 Kb DNA Ladder” (Lad.) (Gibco BRL).

Figura 24: Eletroforese em gel de agarose 1% da 2ª extração de DNA total de folhas de *Vochysia pyramidalis*: indivíduos P2a-P2h de Andaraí-BA e indivíduos P1a-P1c de Alto Paraíso de Goiás-GO, usando como marcadores “1 Kb DNA Ladder” (Gibco BRL) (Lad.)

Figura 25: Eletroforese em gel de agarose 1% da 2ª extração de DNA total de folhas de *Vochysia pyramidalis*: Indivíduos P3a-P3i de Palmeiras-BA e indivíduos P4a-P4i de UnB-Brasília-DF, usando como marcadores “1 Kb DNA Ladder” (Gibco BRL) (Lad.)

Figura 26: Quantificação de DNA em papel parafilm. A 1ª linha corresponde ao padrão Lambda DNA nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 ng/μL; a 2ª linha corresponde aos indivíduos de T2a a T2e de *Vochysia tucanorum* da população de Botucatu – SP; a 3ª linha corresponde aos indivíduos de T6a a T6f de *Vochysia tucanorum* da população de Perdões – MG; a 4ª linha corresponde aos indivíduos de T3a a T3e de *Vochysia tucanorum* da população de Santana do Riacho – MG.

Figura 27: Quantificação de DNA em papel parafilm. A 1ª linha corresponde ao padrão Lambda DNA nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 ng/μL; a 2ª linha corresponde aos indivíduos de T7a a T7h de *Vochysia tucanorum* da população de Sengés – PR; a 3ª linha corresponde aos indivíduos de T5a a T5j de *Vochysia tucanorum* da população de Ibicoara – BA; a 4ª linha corresponde aos indivíduos T4a a T4j de *Vochysia tucanorum* da população de Brasília – DF.

Figura 28: Quantificação de DNA em papel parafilm. A 1ª linha corresponde ao padrão Lambda DNA nas concentrações de 25, 50, 75, 100 e 150 ng/μL; a 2ª linha corresponde aos indivíduos de P1a a P1c de *Vochysia pyramidalis* da população de Alto Paraíso de Goiás – GO; a 3ª linha corresponde aos indivíduos de P2a a P2h de *Vochysia pyramidalis* da população de Andaraí – BA; a 4ª linha corresponde aos indivíduos de P3a a P3i de *Vochysia pyramidalis* da população de Palmeiras – BA; a 5ª linha corresponde aos indivíduos de P4a a P4i de *Vochysia pyramidalis* da população de UnB-Brasília- DF.

Figura 29. Exemplo de reação pré-seletiva em gel de agarose 1,5% do produto da reação de digestão-ligação do DNA de folhas de *Vochysia tucanorum*. 1^a Sequência: T1d, T1e, T1f e T1g, indivíduos da população de Bauru - SP; T2c, T2d, T2e, indivíduos da população de Botucatu (SP); T6a e T6b, indivíduos da população de Perdões (MG). 2^a Sequência: T6c, T6d, T6e e T6f, indivíduos da população de Perdões-MG; T3a, T3b, T3c, T3d e T3e, indivíduos de Santana do Riacho-MG, usando como marcadores "1 Kb DNA Ladder" (Lad.) (Gibco BRL).

Figura 30. Eletroferograma dos fragmentos encontrados em P1b de *Vochysia pyramidalis* da população de Alto Paraíso de Goiás (GO) com a combinação de iniciadores AC-CAT. As linhas vermelhas correspondem ao padrão interno com 50 e 139 pares de bases.

Figura 31. Eletroferograma dos fragmentos encontrados em P4d de *Vochysia pyramidalis* da população da UnB-Brasília (DF) com a combinação de iniciadores AC-CTG. As linhas vermelhas correspondem ao padrão interno com 50 e 139 pares de bases.

Figura 32. Eletroferograma dos fragmentos encontrados em T1f de *Vochysia tucanorum* da população de Bauru (SP) com a combinação de iniciadores ACA-CTG. As linhas vermelhas correspondem ao padrão interno com 50, 139 e 490 pares de bases.

Figura 33. Eletroferograma dos fragmentos encontrados em T6e de *Vochysia tucanorum* da população de Perdões (MG) com a combinação de iniciadores ACT-CAA. As linhas vermelhas correspondem ao padrão interno com 50, 139 e 490 pares de bases.

Figura 34. Análise de coordenadas principais (PCO) de *Vochysia pyramidalis* utilizando uma matriz binária de presença e ausência dos fragmentos de restrição (AFLP) da combinação de 3 diferentes primers (P1) Indivíduos de Alto Paraíso de Goiás (GO), (P2) Indivíduos de Andaraí (BA), (P3) Indivíduos de Palmeiras (BA) e (P4) Indivíduos da UnB-Brasília (DF). As letras correspondem aos indivíduos das populações.

Figura 35. Filograma de *Vochysia pyramidalis* usando o método de distância mínima (Neighbor-Joining) e a medida de distância genética Nei & Li, sendo que os números em vermelho correspondem aos índices de bootstrap de 1000 réplicas com os dados de fragmentos de restrição (AFLP). (P1) Indivíduos de Alto Paraíso de Goiás (GO), (P2) Indivíduos de Andaraí (BA), (P3) Indivíduos de Palmeiras (BA) e (P4) Indivíduos da UnB-Brasília (DF). As letras correspondem aos indivíduos das populações.

Figura 36. Análise de coordenadas principais (PCO) de *Vochysia tucanorum* utilizando uma matriz binária de presença e ausência dos fragmentos de restrição (AFLP) da combinação de 4 diferentes primers (T1) Indivíduos de Bauru (SP), (T2) Indivíduos de Botucatu (SP), (T3) Indivíduos de Santana do Riacho (MG), (T4) Indivíduos do IBGE-Brasília (DF), (T5) Indivíduos de Ibicoara (BA), (T6) Indivíduos de Perdões (MG) e (T7) Indivíduos de Sengés (PR). As letras correspondem aos indivíduos das populações.

Figura 37. Filograma de *Vochysia tucanorum* usando o método de distância mínima (Neighbor-Joining) e a medida de distância genética Nei & Li, sendo que os números em vermelho correspondem aos índices de bootstrap de 1000 réplicas com os dados de fragmentos de restrição (AFLP). . (T1) Indivíduos de Bauru (SP), (T2) Indivíduos de Botucatu (SP), (T3) Indivíduos de Santana do Riacho (MG), (T4) Indivíduos do IBGE-Brasília (DF), (T5) Indivíduos de Ibicoara (BA), (T6) Indivíduos de Perdões (MG) e (T7) Indivíduos de Sengés (PR). As letras correspondem aos indivíduos das populações.

6. RESUMO

Vochysiaceae compreende uma família com duas tribos, oito gêneros e aproximadamente 250 espécies distribuídas predominantemente na América Tropical. *Vochysia pyramidalis* e *V. tucanorum* são espécies arbóreas, a primeira distribuída nas regiões nordeste e central do Brasil e a última apresentando distribuição semelhante, mas alcançando latitudes meridionais até o sul do Paraná. Estas e outras espécies de Vochysiaceae apresentam teores relativamente altos de lipídeos de sementes.

Os lipídeos de sementes de *V. pyramidalis* assemelham-se aos da manteiga de cacau, com altos teores de ácido esteárico e ácido oleico, e os de *V. tucanorum* são ricos em ácidos graxos de cadeia longa, como os ácidos erúcico e docosanóico, assemelhando-se ao óleo original de colza. Os lipídeos de ambas as espécies têm, portanto, potencial valor econômico.

Foi verificado que as proporções dos ácidos graxos das duas espécies podem variar entre populações de diferentes localidades. A proposta do presente trabalho foi detectar variações na distribuição química das duas espécies, a fim de apontar populações com lipídeos dotados de perfis de ácidos graxos mais convenientes para potencial uso medicinal e/ou industrial, e verificar possível conexão entre perfis químicos e genéticos. O último foi estabelecido com base em marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

Foram coletadas sementes e fragmentos de folhas de 3-9 indivíduos de *V. pyramidalis* de populações de Alto Paraíso de Goiás (GO), Andaraí (BA), Palmeiras (BA) e UnB-Brasília (DF), e 5-10 indivíduos de *V. tucanorum* de populações de Bauru (SP), Botucatu (SP), Santana do Riacho (MG), Perdões (MG), IBGE-Brasília (DF), Ibicoara (BA) e Sengés (PR).

Os lipídeos das sementes foram extraídos com hexano. Foram seguidos métodos padronizados para a obtenção dos correspondentes ésteres metílicos dos ácidos graxos. Estes foram analisados por CG/FID e a identificação das substâncias foram baseadas na comparação dos tempos de retenção com aqueles de amostras autênticas de ésteres metílicos de ácidos graxos. A distribuição dos ácidos graxos das duas espécies foi analisada pelo coeficiente de Distância Euclidiana Simples e pelo método de agrupamento UPGMA e Análise de Componente Principal (PCA), usando o programa de computador Fitopac 1.6.4. Dois agrupamentos principais foram obtidos, cada um correspondendo a uma das espécies de

Vochysiaceae. Entretanto, foi notada uma alta semelhança entre amostras da mesma espécie. Em cada espécie, não foi obtido nenhum agrupamento coerente relacionado às populações e localidades. A única exceção correspondeu aos indivíduos da população de *V. pyramidalis* de Alto Paraíso de Goiás, que se agrupou isoladamente de outras amostras da mesma espécie.

Análises de AFLP foram realizadas com DNA extraído de fragmentos de folhas preservados em silicagel, seguidos de procedimentos padronizados de digestão, ligação, amplificações pré-seletiva e seletiva, e análise em seqüenciador automático. Três e quatro combinações de iniciadores foram usadas para *V. pyramidalis* e *V. tucanorum*, respectivamente. Os fragmentos obtidos foram utilizados como caracteres e analisados pelo método de evolução mínima Neighbor-Joining, usando distância de Nei & Li por meio do programa de computador PAUP v. 4.0, e Análise de Coordenada Principal (PCO) usando o programa de computador Fitopac 1.6.4. Assim como ocorreu com os caracteres químicos, pequenas distâncias foram obtidas ao se comparar amostras de cada uma das duas espécies de *Vochysia*. Em análises individuais de cada espécie, não foi obtido nenhum agrupamento coerente com as respectivas populações.

Os resultados do presente trabalho sugerem que a dispersão de indivíduos de *V. pyramidalis* e *V. tucanorum* nas presentes áreas de distribuição é um evento recente, não tendo decorrido tempo suficiente para alcançar diferenças químicas e genéticas detectáveis. Essa observação é coerente com estudos da dispersão de sementes e de pólen, que mostrou uma alta capacidade de dispersão de espécies de *Vochysia*.

Palavras chave: Vochysiaceae, *Vochysia pyramidalis*, *Vochysia tucanorum*, AFLP, Ácidos Graxos, Variação Genética, Composição de sementes.

7. ABSTRACT

The Vochysiaceae comprise a family with two tribes, eight genera and approximately 250 species distributed predominantly in tropical America. *Vochysia pyramidalis* and *V. tucanorum* are tree species, the former distributed in Central, Northeastern and Southeastern Brazil and the latter having similar distribution, but reaching meridional latitudes as far as the south of Paraná. These two species and other Vochysiaceae have been shown to have relatively high levels of seeds lipids.

The seed lipids of *V. pyramidalis* resemble cocoa butter, with high levels of stearic and oleic acids, while *V. tucanorum* seeds are rich in long chain fatty acids, such as erucic and docosanoic, resembling the original rapeseed oil. Hence, lipids of both species of Vochysiaceae have potential economic value.

It has been reported that proportions of seed fatty acids of the two species may vary among populations of different localities. The aim of the present work was to detect variations in chemical profiles of the two species, in order to point out populations with lipids endowed with fatty acid profiles more convenient for potential medical and/or industrial uses, and verify possible connection between chemical and genetic profiles. The latter was established on basis of AFLP (amplified fragment length polymorphism) markers.

Seeds and leaf fragments were collected of 3-9 individuals of *V. pyramidalis* from populations of Alto Paraíso de Goiás (GO), Andaraí (BA), Palmeiras (BA) and UnB-Brasília (DF) and 5-10 of *V. tucanorum* from populations of Bauru (SP), Botucatu (SP), Santana do Riacho (MG), Perdões (MG), IBGE-Brasília (DF), Ibicoara (BA) and Sengés(PR).

Seed lipids were extracted with hexane. Standardized methods were followed to obtain the corresponding fatty acids methyl esters. These were analyzed by GC/FID and identification of the substances were based on comparison of retention times with those of authentic samples of fatty acid methyl esters. The distribution of fatty acids of the samples of the two species was analyzed by Simple Euclidean Distance coefficients, clustering method UPGMA and Principal Component Analysis (PCA) using Fitopac 1.6.4 as computer program. Two main clusters were obtained, each corresponding to one of the Vochysiaceae species. However, a high similarity was noted among samples of the same species. Within each species, no clusters were obtained

coherent with populations and localities. The only exception corresponded to individuals of a population of *V. pyramidalis* of Alto Paraíso de Goiás, which grouped apart from other samples of the same species.

AFLP analyses were carried out with DNA extracted from leaf fragments preserved in silicagel, following the standardized procedures of digestion, ligation, pre and selective amplifications and analysis in automatic sequencer. Three and four primer combinations were used regarding *V. pyramidalis* and *V. tucanorum*, respectively. Fragments obtained were scored as characters and analyzed by the Neighbor-Joining method, using Nei & Li distances in a computer program implemented in PAUP v. 4.0 and Principal Coordinate Analysis (PCO) using Fitopac 1.6.4 as computer program. As with chemical characters, small distances were obtained comparing samples of each the two *Vochysia* species. In the analyses of individuals of each species, no clusters were obtained coherently with the respective population.

The results of the present work suggest that the dispersion of individuals of *V. pyramidalis* and *V. tucanorum* into the present areas of distribution is a recent event, no enough time having been elapsed to reach detectable chemical and genetic differences. This observation is coherent with studies of seed and pollen dispersal, which have shown a high dispersal capacity of *Vochysia* species.

Key words: Vochysiaceae, *Vochysia pyramidalis*, *Vochysia tucanorum*, AFLP, Fatty Acids, Genetic Variation, Seeds composition.

8. ANEXOS

Anexo 1

Protocolo para extração de DNA de plantas

De acordo com “Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.” pg. 128-129.

1. Pese 30-50 mg de tecido seco e macere-o utilizando um pilãozinho de plástico duro (ou um bastão de vidro) através de nitrogênio líquido (até o tecido ficar um pó fino) em um tubo eppendorf;
2. Adicione então 700 µL de Solução tampão de extração e misture (em vórtex ou com um palito de dentes esterilizado) para umedecer o tecido;
3. Encube os tubos em banho-maria a uma temperatura de 60-65°C por no mínimo 30 minutos. Esta incubação pode se prolongar por 60 minutos sem, em geral, alterações nos resultados das extrações. Durante a incubação, agite os tubos a cada 10 minutos para homogeneizar a suspensão;
4. Retire os tubos do banho-maria e deixe-os esfriar em capela de exaustão;
5. Extraia com solvente orgânico adicionando 600 µL de CIA (clorofórmio:álcool isoamílico, 24:1). Agite os tubos durante 5 minutos, invertendo-os no mínimo 20 vezes ou até fazer uma emulsão homogênea;
6. Centrifugue os tubos em microcentrífuga a velocidade máxima (12000 – 15000 rpm) durante 5 minutos;
7. Retire os tubos da centrífuga cuidadosamente, evitando perturbar a interface entre as duas fases formadas. Pipete a fase superior (aquosa) para um novo tubo. Para acelerar essa operação é útil regular a pipeta para 180 µL e retirar 3 alíquotas (~540 µL) fixas.
8. Repetir os passos 5, 6 e 7;
9. Adicione, ao novo tubo, 500 µL de isopropanol frio (-20°C). Misture, gentilmente, para precipitar os ácidos nucleicos. Leve os tubos ao freezer (-20°C) por 30 minutos. (o procedimento de extração pode ser parado neste ponto);
10. Centrifugue os tubos a 7000 rpm por 5 minutos;
11. Descarte o sobrenadante sem perder o pellet;

12. Adicione 1 mL de etanol 70% e deixe em repouso por 10 minutos;
13. Centrifugue os tubos a 7000 rpm por 3 minutos;
14. Descarte o sobrenadante sem perder o pellet;
15. Repita os passos 12, 13 e 14;
16. Adicione 1 mL de etanol absoluto. Deixe o pellet imerso por 3 minutos. Retire o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta;
17. Deixe o pellet secar ao ar;
18. Ressuspenda o pellet em 50 – 100 µL de Água MilliQ;
19. Acrescente 2 µL de RNase em cada tubo. Incube-os em banho-maria a 37°C por, no mínimo, 1 hora para que haja a digestão do RNA.

Anexo 2

Protocolo para a reação de restrição (digestão) de DNA total

1. O DNA utilizado deve estar previamente quantificado e sua qualidade analisada para que não ocorram problemas nas reações futuras;
2. Para cada amostra preparar o mix-enzima a seguir:

- Tampão T4 DNA ligase buffer	2 µL
- Mse I	0,25 µL
- Eco RI	0,50 µL
3. Homogeneizar o mix-enzima em micro-centrífuga na velocidade short-spin;
4. O volume final de reação é de 10 µL;
5. Calcular a quantidade de amostra a ser utilizada que corresponda à concentração de DNA adequada para um resultado satisfatório, o protocolo orienta 25 ng;
6. Completar o volume da reação com água MilliQ;
7. Homogeneizar a reação em micro-centrífuga na velocidade short-spin;
8. Colocar a reação em termociclador com a seguinte programação: 37°C por 2 horas; 70°C por 15 minutos para inativar as enzimas de restrição; 20°C por 30 minutos (opcional).
9. Em seguida, guardar as amostras em freezer (-20°C) ou continuar com a etapa de ligação dos adaptadores.

Anexo 3

Protocolo para a reação de ligação dos adaptadores

1. Antes de preparar o mix-ligação, calcular as quantidades de adaptadores Mse I e Eco RI que serão utilizadas para o total das amostras e proceder à desnaturação em termociclador à 95°C por 5 minutos;
2. Manter no cooler à 20°C;
3. Acrescentar o restante do mix-ligação para cada amostra como segue:
 - Tampão T4 DNA ligase 5x Buffer 2 µL
 - NaCl 0,5 M 1 µL
 - BSA 1 mg/mL 0,5 µL
 - Adaptador Mse I 1 µL
 - Adaptador Eco RI 1 µL
 - T4 DNA ligase 1 µL
4. O volume final da reação é de 12 µL, portanto como o volume do mix-ligação é de 6,5 µL adicionar 5,5 µL da amostra digerida;
5. Deixar a reação overnight à 15-20°C ou por 2 horas à 37°C em termociclador;
6. Em seguida, guardar as amostras em freezer (-20°C) ou continuar com a etapa de pré-amplificação.

Anexo 4

Protocolo para a reação de amplificação pré-seletiva

1. Diluir o produto da reação de ligação 1:10 ou 1:15 em Água MilliQ. É necessário fazer testes com as amostras para verificar qual a melhor diluição;
2. Em tubos para PCR 0,2 mL misturar (para cada amostra):
 - 2 µL do produto da ligação diluído;
 - 0,5 µL dos primers (iniciadores) pré-seletivos para AFLP de acordo com o Kit Regular ou Small utilizado;
 - 7,5 µL AFLP Core Mix (que contém os itens comuns necessários para reação de amplificação em termo-ciclador).
3. Antes de colocar no termociclador, as reações devem sempre ficar no gelo;
4. Colocar a reação no termociclador (PCR) com a seguinte programação: 72°C por 2 minutos; 40 ciclos: 94°C por 20 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos; 60°C por 30 minutos; manter 10°C infinito.
5. Verificar o resultado em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1x, com Ladder 100 bp em eletroforese (40V) utilizando 4 µL de amostra;
6. Em seguida, guardar o produto pré-seletivo em freezer (-20°C) ou continuar com a etapa de amplificação seletiva.

Anexo 5

Protocolo para a reação de amplificação seletiva

1. O produto da reação pré-seletiva pode ser utilizado desde sem diluição até uma diluição 1:10 ou 1:15 em água MilliQ. Fazer testes com as amostras e verificar a melhor diluição;
2. Em tubos para PCR 0,2 mL misturar (para cada amostra):
 - 7,5 µL core mix
 - 0,5 µL dos iniciadores (primers) Mse I (Cxx)
 - 0,5 µL dos iniciadores (primers) Eco RI (Axx* - Kit Regular ou Ax* - Kit Small)
 - 1,5 µL do produto da pré-seletiva diluído ou não.
3. Fazer um tubo para cada combinação desejada;
4. Enquanto as reações não são colocadas no termociclador, devem ficar no gelo;
5. Não expor os tubos com as reações de amplificação nem os frascos com os iniciadores excessivamente à luz porque a marcação com fluorescência pode ser afetada;
6. Colocar a reação no termociclador (PCR) com a seguinte programação: 94°C por 2 minutos; 10 ciclos: 94°C por 20 segundos, 66°C por 30 segundos com redução de 1°/segundo, 72°C por 2 minutos; 20 ciclos: 94°C por 20 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos; 60°C por 30 minutos; manter 10°C infinito.
7. Não guardar as amostras por mais de 2 dias em freezer (-20°C) pois pode ocorrer alteração no resultado final. Se possível, continuar o processo no mesmo dia.

9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, M.U., HUSAIN, S.K. & OSMAN, S.M. 1981. Ricinoleic acid in *Phyllanthus niruri* seed oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 58: 673-674.
- APG [ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP] II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 141: 399-436.
- APG [ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP] III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 161: 105-121.
- APPLIED BIOSYSTEMS. 2000. *AFLP Plant Mapping Protocol*.
- ARANGO-ULLOA, J., BOHORQUEZ, A., DUQUE, M.C. & MAASS, B.L. 2009. Diversity of the calabash tree (*Crescentia cujete* L.) i Colombia. *Agroforest Syst.* 76: 543-553.
- ATTAMA, A.A., SCHICKE, B.C. & MULLER-GOYMANN, C.C. 2006. Further characterization of theobroma oil-beeswax admixtures as lipid matrices for improved drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 64: 294-306.
- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A. & STRUHL, K. 2003. *Current protocols in molecular biology: preparation and analysis of DNA*. Volume 1, John Wiley & Sons, Inc.
- BAER, D.J., JUDD, J.T., KRIS-ETHERTON, P.M., ZHAO, G. & EMKEN, E.A. 2003. Stearic acid absorption and its metabolizable energy value are minimally lower than those of other fatty acids in healthy men fed mixed diets. *In: The Journal of Nutrition, Human Nutrition and Metabolism*, 4129-4134.
- BANERJI, R.; CHOWDHURY, A.R.; MISRA, G. & NIGAM, S.K. 1984. Butter from plants. *Fette, Seifen, Anstrichm.* 7: 279-284.

- BERGER, K.G. 1986. Palm oil products – why and how to use them. *Fat. Sci. Technol.* 88: 250-258.
- BOUAID, A., MARTINEZ, M. & ARACIL, J. 2007. Long storage stability of biodiesel from vegetable and used frying oils. *Fuel* 86: 2596-2602.
- BOUAID, A., MARTINEZ, M. & ARACIL, J. 2007. A comparative study of the production of ethyl esters from vegetable oils as a biodiesel fuel optimization by factorial design. *Chemical Engineering Journal* 134: 93-99.
- BOUFTASS, F., LABHILILI, M., EZZAHIRI, B. & ZIOUTI, A. 2010. Molecular polymorphism of the wheat leaf rust fungus in Morocco using amplified fragment length polymorphism. *Phytopathol* 158: 111-116.
- BRUCE, J.S. & SALTER, A M. 1996. Metabolic fate of oleic acid, palmitic acid and stearic acid in cultured hamster hepatocytes. *Biochem.J.* 316, 847-852. Inc: Great Britain.
- BUERKI, S., CALLMANDER, M.W., SCHUPFER, F., RAVOKATRA, M., KUPFER, P. & ALVAREZ, N. 2009. Malagasy *Dracaena* Vand. Ex L. (Ruscaceae): an investigation of discrepancies between morphological features and spatial genetic structure at a small evolutionary scale. *Plant Syst. Evol.* 280: 15-28.
- CALDERÓN, A.I., ESPÓSITO-AVELLA, M., DE TELLO, R.E.B., PEZZUTO, J.M., SÁNCHEZ, C. & GUPTA, M.P. 2001. Anti-inflammatory and analgesic activities of *Vochysia ferruginea*. *Pharmaceutical Biology*, 39:1, 35-39.
- CAVERS, B.S., NAVARRO, C., HOPKINS, P., ENNOS, R.A. & LOWE, J. 2005. Regional and population-scale influences on genetic diversity partitioning within Costa Rican populations of the pioneer tree *Vochysia ferruginea* Mart. *Silvae Genetica* 54, 6.
- CHRISTIE, W.W. 1982. *Lipid analysis: isolation, separation, identification and structural analysis of lipids*. Pergamon Press. 2^a ed.

- COMES, H. P. & ABBOTT, R. J. 1998. The relative importance of historical events and gene flow on the population structure of a Mediterranean ragwort, *Senecio gallicus* (Asteraceae). *Evolution* 52: 355-367.
- COUTINHO, L.M. 1978. O conceito de cerrado. *Revta. Brasil. Bot.* 1: 17-23.
- CRONQUIST, a. 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press, New York.
- CRUPKIN, M. & ZAMBELLI, A. 2008. Detrimental impact of trans fats on human health: stearic acid-rich fats as possible substitutes. *Comp Rev Food Sci Food Safety* 7: 271-279.
- CUI-PING, C., OLIVER, G., ISKANDAR Z. S., ULFAH J. S. & REINER, F. 2009. Genetic variation in nine *Shorea* species (Dipterocarpaceae) in Indonesia revealed by AFLPs. *Tree Genetics & Genomes* 5: 407-420.
- DAVIES, H.M. & FLIDER, F.J. 1994. Designer oils. *Chemtech* 24: 33-37.
- DODD, R. S., AFZAL-RAFII, Z., KASHANI, N. & BUDRICK, J. 2002. Land barriers and open oceans: effects on gene diversity and population structure in *Avicennia germinans* L. (Avecenniaceae). *Molecular Ecology* 11: 1327-1338.
- DONINI, P., ELIAS, S.M., BOUGOURD, S.M. & KOEBNER, R.M.D. 1997. AFLP fingerprinting reveals pattern differences between template DNA extracted from different plant organs. *Genome* 40: 521-526.
- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. 1987. A rapid isolation for small quantities of fresh leaf material. *Phytochem. Bull. Soc. Amer.* 19: 11 - 15.
- DURIGAN, G., BAITELLO, J.B., FRANCO, G.A.D.C. & SIQUEIRA, M.F. 2004. *Plantas do cerrado paulista. Imagens de uma paisagem ameaçada*. Instituto Florestal, Secretaria do Meio Ambiente. Páginas & Letras Editora e Gráfica Ltda.

- EMKEN, E.A., ADLOF, R.O., ROHWEDDER, W.K. & GULLEY, R.M. 1993. Biochim. Biophys. *In: Acta* 1170: 173-181.
- FAY, M.F., COWAN, R.S. & LEITCH, I.J. 2005. The effects of nuclear DNA content (C-value) on the quality and utility of AFLP fingerprints. *Annals of Botany* 95: 237-246.
- FELFILI, J.M., REZENDE, A.V. & SILVA JÚNIOR, M.C. 2007. *Biogeografia do bioma cerrado: vegetação e solos da Chapada dos Veadeiros*. Editora UnB.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783-791.
- FERREIRA, M.A & GRATTAPAGLIA, D. 1995. *Introdução ao uso de RAPD E RFLP em análise genética*. 1ª ed. 220 pp. Embrapa-Cenargen, Brasília.
- FERREIRA, M.A & GRATTAPAGLIA, D. 1996. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2ª ed. 220 pp. Embrapa-Cenargen, Brasília.
- GARCIA, A.M., SCHRAUF, G.E., GONZALEZ, L.P., NARANJO, C.A., DUPAL, M.P., SPANGENBERG, G.C. & FORSTER, J.W. 2009. Use of AFLP and RAPD molecular genetic markers and cytogenetic analysis to explore relationships among taxa of the Patagonian *Bromus setifolius* complex. *Genetics and Molecular Biology* 2:312-319.
- GASPI, F.O.G., FOGLIO, M.A., CARVALHO, J.E. & MORENO, R.A. 2006. Pharmacological activities investigation of crude extracts and fractions from *Qualea grandiflora* Mart. *Journal of Ethnopharmacology* 107:19-24.
- GOMES, R.C., BONAMIN, F., DARIN, D.D., SEITO, L.N., DI STASI, L.C., DOKKEDAL, A.L., VILEGAS, W., BRITO, A.R.M.S. & HIRUMA-LIMA, C.A. 2009. Antioxidative action of methanolic extract and buthanolic fraction of *Vochysia tucanorum* Mart. In the gastroprotection. *Journal of Ethnopharmacology* 121: 466-471.

- GOTTLIEB, A. M., GIBERTI, G. C. & POGGIO, L. 2005. Molecular analyses of the genus *Ilex* (Aquifoliaceae) in Southern South America, evidence from AFLP and ITS sequence data. *American Journal of Botany* 92: 352–369.
- GOTTSBERGER, G. & SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. 2006. *Life in the Cerrado. A South American Tropical Seasonal Ecosystem*. AZ Druck und Datentechnik GmbH, vol. II, 1^a ed.
- GRAILLE, J. 1993. Usages alimentaires et oléochimiques du complexe laurique. *Oléagineux* 48: 515-525.
- GUDERIAN JR, D.M., RASMUSSEN, H.E., WRAY, C.A., DUSSAULT, P.H. & CARR, T.P. 2007. Cholesterol-lowering properties of plant sterols esterified with beef tallow fatty acids in hamsters. *Nutrition Research* 27: 283-288.
- HAYKIRI-AÇMA, H. 2003. Combustion characteristics of different biomass materials. *Energy conversion and management* 44(1): 155-162.
- HESS, S.C., BRUM, R.L., HONDA, N.K., CRUZ, A. B., MORETTO, E., CRUZ, R.B., MESSANA, I., FERRARI, F., CECHINEL FILHO, V. & YUNES, R.A. 1995. Antibacterial activity and phytochemical analysis os *Vochysia divergens* (Vochysiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 47:97-100.
- HESS, S.C. & DELLE MONACHE, F. 1999. Divergioic acid , a triterpene from *Vochysia divergens*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 10(2): 104-106.
- HIRUMA - LIMA, C.A., SANTOS, L.C., KUSHIMA, H., PELLIZZON, C.H., SILVEIRA, G.G., VASCONCELOS, P.C.P., VILEGAS, W. & SOUZA BRITO, A.R.M. 2006. *Qualea grandiflora*, a Brazilian “Cerrado” medicinal plant presents an important antiulcer activity. *Journal of Ethnopharmacology* 104: 207-214.
- JENAB, E., REZAEI, K. & EMAM-DJOMEH, Z. 2006. Canola oil extracted by supercritical carbon dioxide and a commercial organic solvent. *Eur.J.Lipid.Sci.Technol.* 108: 488-492.

- KABARA, J.J. 1984. Medium-chain fatty acids and esters as antimicrobial agents. *In: Kabara, J.J. ed.. Cosmetic and drug preservation. Principles and practice.* Marcell Dekker, Inc. New York.
- KARP, A., SEBERG, O. & BUIATTI, M. 1996. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Annals of Botany* 78: 143-149.
- KRIS-ETHERTON, P.M. , DERR, J., MITCHELL, D.C., MUSTAD, V.A., RUSSELL, M.E., MCDONNELL, E.T., SALABSKY, D. & PEARSON, T.A. 1993. The role of fatty acid saturation on plasma lipids, lipoproteins, and apolipoproteins: i. effects of whole food diets high in cocoa butter, olive oil, soybean oil, dairy butter, and milk chocolate on the plasma lipids of young men. *Metabolism* 42: 121-129.
- KRIS-ETHERTON, P.M. & MUSTAD, V.A. 1994. Chocolate feeding studies: a novel approach for evaluating the plasma lipid effects of stearic acid. *American Journal of Clinical Nutrition* 60: 1029s-1036s, Inc. The American Society for Clinical Nutrition.
- KROPF, M., KADEREIT, J. W. & COMES, H. P. 2002. Late Quaternary distributional stasis in the submediterranean mountain plant *Anthyllis montana* L. (Fabaceae) inferred from ITS sequences and amplified fragment length polymorphism markers. *Molecular Ecology* 11: 447-463.
- LAMOTE, V., ROLDAN-RUIZ, I., COART, E., DE LOOSE, M. & VAN BOCKSTAELE, E. 2002. A study of genetic variation in *Iris pseudacorus* population using amplified fragment length polymorphism (AFLPs). *Aquatic Botany* 73: 19-31.
- LAURENTIN, H. 2009. Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. *Genet Resour Crop Evol* 56: 277-292.
- LEDRU, M.P., SALATINO, M.L.F., CECCANTINI, G., SALATINO, A., PINHEIRO, F. & PINTAUD, J.C. 2007. Regional assessment of the impact of climatic change on the distribution of a tropical conifer in the lowlands of South America. *Diversity and Distributions*.

- LITT, A. & STEVENSON, D.W. 2003. Floral development and morphology of Vochysiaceae. II. The position of the single fertile stamen. *American Journal of Botany* 90 (11): 1548-1559.
- LORENZI, H. 1992. *Árvores Brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Editora Plantarum Ltda.
- MAYWORM, M.A.S. 1999. *Carboidratos e proteínas de sementes e lipídeos de Vochysiaceae*. Tese apresentada ao Instituto de Biociências da USP, SP.
- MAYWORM, M.A.S. & SALATINO, A. 2002. Distribution of seed fatty acids and the taxonomy of Vochysiaceae. *Bioch. Syst. Ecol.* 30:961-972.
- MAYWORM, M.A.S., BUCKERIDGE, M.S., MARQUEZ, U.M.L. & SALATINO, A. 2010. Nutricional reserves os Vochysiaceae seeds: chemical diversity and potencial economic uses. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* – aceito para publicação.
- MCKINNON, G.E., VAILLANCOURT, R.E., STEANE, D.A. & POTTS, B.M. 2008. A AFLP marker approach to lower-level systematics in Eucalyptus (Myrtaceae). *American Journal of Botany* 95 (3): 368-380.
- MEHTA, J.L., SANADA, N., HU, C.P., CHEN, J., DANDAPAT, A, SUGAWARA, F., SATOH, H., INOUE, K., KAWASE, Y., JISHAGE, K., SUZUKI, H., TAKEYA, M., SCHNACKENBERG, L., BEGER, R., HERMONAT, P.L., THOMAS, M. & SAWAMURA, T. 2007. Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet. *Circulation Research*. 100:1634. American Heart Association Inc.
- MELLO-SILVA, R. 1989. *Velloziaceae de Grão-Mogol, Minas Gerais, Brasil*. Tese apresentada ao Instituto de Biociências da USP, SP.
- METZGER, J.O. & BORNSCHEUER, U. 2006. Lipids as renewable resources: current state of chemical and biotechnological conversion and diversification. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 71: 13-22.

- MIGUEL, M. & BROWSE, J. 1995. Lipid biosynthesis in developing seeds. *In*: Kigel, J. & Galili, G., eds. *Seed development and germination*. New York, Marcel Dekker.
- NEI, M. & LI, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*. 76: 5269–5273.
- OLIVEIRA, P. & GIBBS, P. 1994. Pollination biology and breeding systems of six *Vochysia* species (Vochysiaceae) in Central Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 10: 509-522.
- PAMIDIAMARRI, D.V.N.S., PANDYA, N., REDDY, M.P. & RADHAKRISHNAN, T. 2009. Comparative study of interspecific genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* by RAPD and AFLP. *Mol. Biol. Rep.* 36: 901-907.
- PASSOS V.M. & FRANÇA, F. 2003. *Vochysiaceae da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil*. Universidade Estadual de Feira de Santana.
- PAULA, J.E., JUNIOR, F.G.S. & SILVA, A P.P. 2000. Caracterização anatômica de madeiras nativas de matas ciliares do centro-oeste brasileiro. *Scientia Forestalis* 58: 73-89.
- PIAZZA, G.J. & FOGLIA, T.A. 2001. Rapeseed oil for oleochemical usage. *Eur.J.Lipid.Sci.Technol.* 103: 450-454.
- PINTO A.C., GUARIEIRO L.N., REZENDE M.J.C., RIBEIRO N.M., TORRES E.A., LOPES W.A., PEREIRA P.A.P., ANDRADE J.B. 2005. Biodiesel: an overview. *J Braz Chem Soc* 16: 1313-1330.
- RAVEN, P.H., EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. 2007. *Biologia Vegetal*. 7ª ed. Ed. Guanabara Koogan S.A.
- RIBEIRO, J.F. 1998. *Cerrado: matas de galeria*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC.
- RIBEIRO, J.F., FONSECA, C.E.L. & SOUSA-SILVA, J.C. 2001. *Cerrado, caracterização e recuperação de Matas de Galeria*. EMBRAPA Cerrados. 1ª ed. Planaltina, DF.

- RIESEBERG, L.H. 1996. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Molecular Ecology* 5: 99-103.
- ROBINSON, J.P. & HARRIS, S.A. 1999. Amplified Fragment Length Polymorphisms and Microsatellites: A phylogenetic perspective. In *Which DNA marker for which purpose?* (E.M. Gillet ed.). <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>
- ROUPPE-VAN DER VOORT, J.N.A., VAN ZANDVOORT, P., VAN ECK, H.J., FOLKERTSMA, R.T., HUTTEN, R.C.B., DRAAISTRA, J., GOMMERS, F.J., JACOBSEN, E., HELDER, J. & BAKKER, J. 1997. Use of allele specificity of comigrating AFLP markers to align genetic maps from different potato genotypes. *Molecular and General Genetics* 255: 438-447.
- ROZO, Y., QUINTERO, L., PARRA, M., RODRÍGUEZ, C. & MELGAREJO, L.M. 2009. Analysis of genetic variability in *Couepia* accessions using AFLP markers. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 56:77-83.
- SAITOU N., NEI M. 1987 The neighbour joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology & Evolution*. 4: 406–425.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2a. ed. CSH, New York.
- SCARIOT, A., SOUSA-SILVA, J.C. & FELFILI, J.M. 2005. *Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília-DF.
- SCHONSWETTER, P., PAUN, O., TRIBSCH, A. & NIKLFELD, H. 2003. Out of the Alps: colonization of northern Europe by East Alpine populations of the Glacier Buttercup *Ranunculus glacialis* L. (Ranunculaceae). *Molecular Ecology* 12: 3373-3381.
- SCHONSWETTER, P., TRIBSCH, A., STEHLIK, I. & NIKLFELD, H. 2004. Glacial history of high alpine *Ranunculus glacialis* (Ranunculaceae) in the European Alps in a comparative phylogeographical context. *Biological Journal of the Linnean Society* 81: 183-195.

- SGORBATI, S. LABRA, M., GRUGNI, E., BARCACCIA, G., GALAZO, G., BONI, U., MUCCIARELLI, M., CITTERIO, S., IRAMATEGUI, A.B., GONZALES, L.V. & SCANNERINI, S. 2004. A survey of genetic diversity and reproductive biology of *Puya raimondii* (Bromeliaceae), the endangered queen of the Andes. *Plant Biology* 6: 222-230.
- SHANJANI, P.S., MARDI, M., PAZOUKI, L., HAGIDIMITRIOU, M., AVANZATO, D., PIRSEYEDI, S.M., GHAFARI, M.R. & NEKOU, S.M.K. 2009. Analysis of the molecular variation between and within cultivated and wild *Pistacia* species using AFLPs. *Tree Genetics & Genomes* 5: 447-458.
- SHARBEL, T. F., HAUBOLD, B. & MITCHELL-OLDS, T. 2000. Genetic isolation by distance in *Arabidopsis thaliana*: biogeography and postglacial colonization of Europe. *Molecular Ecology* 9: 2109-2118.
- SHEPHERD, G.J. 2006. FITOPAC 1.6.4. *Manual de usuário*. Departamento de Botânica, UNICAMP.
- SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., DE MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A. & PETROVICK, P.R. 2004. *Farmacognosia. Da planta ao medicamento*. Editora da UFSC.
- SIMPSON, B.B. & OGORZALY, M.C. 1995. *Economic Botany: plants in our world*. 2ªed. New York: Mc Graw-Hill, 742p.
- SILVA JUNIOR, M.C., 2005. *100 Árvores do Cerrado. Guia de campo*. Rede de sementes do Cerrado.
- SILVA, S.I. 1998. *Euphorbiaceae da caatinga: distribuição de espécies e potencial oleaginoso*. Tese apresentada no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. SP.
- SOUZA, V.C. & LORENZI, H. 2005. *Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda.

- SOUZA, V.C. & LORENZI, H. 2008. *Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda.
- STEHLIK, I., SCHENELLER, J. J. & BACHMANN, K. 2001. Resistance or emigration: response of the high-alpine plant *Eritrichium nanum* (L.) Gaudin to the ice age within the Central Alps. *Molecular Ecology* 10: 357-370.
- SYTSMA, K.J., LITT, A., ZJHRA, M.L., PIRES, J.C., NEPOKROEFF, M., CONTI, E., WALKER, J. & WILSON, P.G. 2004. Clades, clocks and continents: historical and biogeographical analysis of Myrtaceae, Vochysiaceae and relatives in the Southern hemisphere. *International Journal of Plant Sciences*, 165 (4 Suppl.): S85-S105.
- SWOFFORD, D. L. 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- TAKHTAJAN, A. 1997. *Diversity and classification of flowering plants*. Columbia University Press, New York.
- TREMETSBERGER, K., STUESSY, T.F., GUO, Y., BAEZA, C.M., WEISS, H. & SAMUEL, R.M. 2003. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) variation within and among populations of *Hypochaeris acaulis* (Asteraceae) of Andean southern South America. *Taxon* 52: 237-245.
- VINSON, J.A., PROCH, J., BOSE, P., MUCHLER, S., TAFFERA, P., SHUTA D., SAMMAN, N. & AGBOR, G.A. 2006. Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, an antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American diets. *Journal of agricultural and food chemistry* 54 (21): 8071-8076.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. & ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23: 4407-4414.

- WENIGER, B., LOBSTEIN, A., UM, B-H., VONTHRON-SÉNÉCHAU, C., ANTON, R., USUGA, N.J., BASARAN, H. & LUGNIER, C. 2005. Bioactive triterpenoids from *Vochysia pacifica* interact with cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme PDE4. *Phytotherapy Research* 19:75-77.
- WHITE, P.J. 1992. Fatty acids in oilseeds (vegetable oils). *In*: Chow, C.K. ed.. *Fatty acids in foods and their health implications*. Marcel Dekker, Inc. NY.
- ZHANG, L. B., COMES, H. P. & KADEREIT, J. W. 2001. Phylogeny and Quaternary history of the European montane/alpine endemic *Soldanella* (Primulaceae) based on ITS and AFLP variation. *American J. Bot.* 88: 2331-2345.
- ZUCARO, Y.L., COMPAGNONE, R.S., HESS, S.C. & DELLE MONACHE, F. 2000. 6 beta-hydroxymaslinic acid, a triterpene from *Vochysia ferruginea*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 11(3): 241-244.