



**Diversidade genética em uma população natural de *Eugenia uniflora*  
(O. Berg) no Pampa gaúcho baseada em marcadores moleculares SSR**

**Fernanda Alves Pereira**

**Orientador:** Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Valdir Marcos Stefenon

Maio 2013.

**Fernanda Alves Pereira**

**Diversidade genética em uma população natural de *Eugenia uniflora*  
(O. Berg) no Pampa gaúcho baseada em marcadores moleculares SSR**

Trabalho apresentado como requisito  
para obtenção do grau de Bacharel  
no Curso de Ciências Biológicas

São Gabriel, 2013.

**Fernanda Alves Pereira**

**Diversidade genética em uma população natural de *Eugenia uniflora*  
(O. Berg) no Pampa gaúcho baseada em marcadores moleculares SSR**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado como requisito para  
obtenção do grau de Bacharel  
no Curso de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal do Pampa.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovada em:

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon  
Ciências Biológicas- Unipampa

---

Prof. Dr. Fabiano Pimentel Torres  
Ciências Biológicas- Unipampa

---

Prof. Dr. Filipe de Carvalho Victoria  
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Antártico de Pesquisas Ambientais- INCT-  
APA - Unipampa

## **Agradecimentos**

A minha mãe Sandra, por ser base na minha educação, pelo constante apoio, por ser pai e mãe, amiga e por não me deixar nos momentos difíceis e alegres. Essa conquista também é tua!

A minha família que sempre me apoiou e me incentivou, Paula, Cecília, Eva, Jussara, Alexandre e Lia.

As minhas madrinhas que me apoiaram, e mandaram muitas vibrações positivas quando mais precisei, não deixando-me desistir nunca.

Aos colegas de laboratório pelas conversas e troca de conhecimento, Nathana Corneleo, Jordana Nagel, Lilian Machado e Rayssa Medina.

Ao meu orientador Valdir Stefenon, pelos ensinamentos, apoio e confiança.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	6
1.INTRODUÇÃO.....	7
1.1 Origem.....	7
1.2 Bioma Pampa.....	9
2.OBJETIVOS.....	10
3. METODOLOGIA.....	10
3.1 EXTRAÇÃO DO DNA.....	10
3.2 ANÁLISE MOLECULAR.....	11
3.4.Corrída Eletroforética.....	12
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
5.CONCLUSÃO.....	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	17

## Resumo

A *Eugenia uniflora* (Myrtaceae), popularmente conhecida como pitangueira, é uma espécie arbórea nativa da Mata Atlântica brasileira, podendo ser encontrada também em outros países da América e na África. A planta adulta pode alcançar até 10 m de altura com tronco irregular, ramificado, de cor avermelhada. A madeira é utilizada como lenha, e a ingestão da infusão de suas folhas é utilizada na cura de distúrbios estomacais, segundo a medicina popular. O objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade genética de uma população natural de *E. uniflora*, do município de São Borja na região oeste do pampa gaúcho. Amostras foliares foram coletadas de indivíduos adultos para extração de DNA e posterior análise molecular através de marcadores moleculares. Dois locos microssatélites foram amplificados e analisados com auxílio do software GenAlEx. Os dados sugerem a necessidade de conservação dessa espécie no Pampa gaúcho, considerando o relativamente alto índice de diversidade genética (número de alelos e  $H_e$ ) e a provável ocorrência de cruzamentos entre indivíduos aparentados.

Palavras-chave: Myrtaceae, pitangueira, heterozigosidade observada, heterozigosidade esperada

## Abstract

The *Eugenia uniflora* (Myrtaceae), popularly known as surinan cherry, is a tree native to the Brazilian Atlantic Forest and can be found also in other Latin American countries and Africa. The adult plant can reach up to 10 meters in height with trunk irregularly branched, reddish in color. The wood is used as firewood and drinking the infusion of its leaves is used to cure stomach ailments, according to folk medicine. The objective of this study was to analyze the genetic diversity of a natural population of *E. uniflora* in the municipality of São Borja in the western region of the pampas gaúcho. Leaf samples were collected from adult plants for DNA extraction and subsequent analysis using molecular markers. Two microsatellite loci were amplified and analyzed with the aid of the software GenAlEx. The data suggest the need for conservation of this species in the Pampa gaúcho, considering the relatively high level of genetic diversity (number of alleles and  $H_e$ ) and the probable occurrence of crosses between related individuals.

Keywords: Myrtaceae, surinan cherry, observed heterozygosity, expected heterozygosity.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Origem

Originária do Brasil, a pitangueira [*Eugenia uniflora* (O. Berg)] encontra-se praticamente em toda extensão territorial do país, desenvolve-se bem em locais de clima quente e úmido, uma vez que se adapta favoravelmente às diferentes condições climáticas e edáficas (LIMA, MELO & LIMA, 2002 apud MORTON, 1987). Desse modo, a *E. uniflora* é difundida desde o Nordeste até o Rio Grande do Sul, ultrapassando fronteiras, espalhando-se por diversos países da América do Sul e África. Ainda que a planta seja nativa de um dos mais importantes Biomas Brasileiros, a Mata Atlântica, é encontrada em vegetações distintas a de sua origem. É bastante versátil, já que cresce em diferentes ambientes como planície arenosa perto do mar no sudeste e sul do Brasil.

A *E. uniflora* pertence à família Myrtaceae compreende cerca de 130 gêneros e 4.000 espécies de plantas lenhosas, com distribuição predominantemente pantropical e subtropical, concentrada na região neotropical e na Austrália (Souza e Lorenzi, 2005). Suas espécies são arbustivas ou arbóreas, com folhas inteiras, de disposição alterna ou oposta e, às vezes, oposta cruzada, com estípulas muito pequenas (Joly, 1977).

A planta pode alcançar até 10 metros de altura com tronco irregular e ramificado. As folhas têm forma oval, quando maceradas possuem aroma característico. A floração (Figura 1) da pitangueira é abundante de coloração branca, e a época em que florescem diverge de agosto a novembro. Já o período de frutificação é entre outubro a janeiro. As formas de uso da planta são bastante variadas, no que concerne à produção e comercialização da fruta, não se dispõe de dados oficiais, tanto no Brasil quanto no mundo, no entanto estima-se que o Brasil seja o maior produtor mundial. (Bezerra et al., 2000). Trata-se de uma fruta (Figura 2) muito apreciada e a sua polpa é agridoce e perfumada, através desta são obtidos geléias, vinhos, doces e licores, além disso, vem ganhando atenção em outros países pelo seu sabor exótico e conteúdo de vitaminas A e C, onde tem sido reconhecida como alimento natural e saudável (Ribeiro, 1998). Portanto, existem grandes perspectivas de sua utilização nas misturas entre sucos de outras frutas, como também pode ser utilizada como aditivo em bebidas lácteas e, ainda, na forma de frescos em pó e néctares (Bezerra et al., 2000).



Figura 1: Flores de *E. uniflora*.

Segundo, Almeida et al. (1995), a planta apresenta compostos fenólicos com ação antioxidante e algumas com ação hipoglicemiante e anti-reumáticas, também utilizadas em distúrbios estomacais e como anti-hipertensiva. De acordo com a medicina popular a ingestão da infusão de suas folhas tem aplicação principalmente como hipotensor, anti-gota e estomáquico. Em vista disso é que atualmente existem várias pesquisas farmacológicas sobre medicamentos fitoterápicos, mas nenhuma delas pôde afirmar sua eficácia.

Apesar desta ampla aplicação de seus produtos não-madeireiros, um estudo realizado por Costella et al. (2013) mostra que a espécie pode desaparecer de algumas áreas, já que está sendo utilizada principalmente após o corte da mesma, com objetivo de usufruí-la como lenha.

Pouco se sabe sobre a estrutura genética em pequena escala de populações de *E. uniflora*, para isso é culminante entender processo como o fluxo gênico, provendo indicações à conservação da espécie no ambiente.



Figura 2: Frutos de pitangueira.



## 1.2 Bioma Pampa

Bioma é um conjunto de tipos de vegetação que abrange grandes áreas contínuas, em escala regional, com flora e fauna similares, definido pelas condições físicas predominantes nas regiões. No Brasil, são encontrados seis Biomas distintos, Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal e Pampa (Pillar et. al., 2009).

O Pampa, também denominado Campos Sulinos, está presente somente no Rio Grande do Sul, ocupando 63% do território do estado, e se estende pelo Uruguai e Argentina (Figura 3). O clima é marcado por invernos rigorosos e temperaturas negativas, verão com temperaturas médias de 34°C, e primavera chuvosa. É um ecossistema natural com grande diversidade de espécies animais e vegetais, sua conservação, porém, tem sido ameaçada pela degradação associada à invasão de espécies exóticas, além de seu uso inadequado. A fragilidade natural do solo, combinado com as condições climáticas mostram que as atividades humanas inadequadas levaram a degradação dos solos intensa. (Roesch et. al., 2009)



Figura 3: Localização do Bioma Pampa. Fonte: Santino, 2004.

## 2. OBJETIVOS

A finalidade deste trabalho foi analisar a diversidade genética de uma população natural de *E. uniflora*, do município de São Borja, localizado na região da fronteira oeste do Rio Grande do Sul, no Pampa Gaúcho.

## 3. METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado com base em amostras foliares, de quinze indivíduos adultos de pitangueira, as quais foram coletadas na Mata Ciliar do Rio Uruguai, localizado na área de estudo. O esforço de coleta na área teve duração de aproximadamente quatro a cinco horas de caminhada e todos os indivíduos encontrados na mata ciliar foram coletadas amostras foliares. As folhas coletadas de cada exemplar foram armazenadas em recipientes separados, contendo sílica gel, que tem função de absorver umidade, evitando a proliferação de fungos nas amostras.

### 3.1 EXTRAÇÃO DO DNA

Na extração do DNA, realizada de acordo com o protocolo proposto por Doyle & Doyle (1987), adaptado por Stefenon et al. (2004). Foram utilizadas aproximadamente 150 mg de folhas, que foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas completamente em gral de porcelana. Ao pó resultante, acrescenta-se 1,5 mL de tampão de extração [CTAB 2%; NaCl 1,5M; EDTA 20 mM; Tris-HCl (pH 8,0) 100mM; PVP 2%; 2-mercaptoetanol 1%]. Logo após o material foi transferido para tubos eppendorf de 2mL e mantido em banho-maria (60°C) por 40 min. A cada 15 minutos, o material foi homogeneizado por inversão. Após essa etapa, o material foi deixado sobre a bancada até alcançar a temperatura ambiente, quando lhe forem acrescentados, em cada tubo, 600 µL de CIA [clorofórmio: álcool isoamílico 24:1]. O material foi homogeneizado novamente durante três minutos, por inversão, e centrifugado a 13.000 RPM, por 5 min. A porção aquosa que continha o DNA foi transferida para novos tubos e acrescentados a ela 5 µL de RNase A (10 µg/mL). Após 40 minutos, a 34 °C realizou-se uma segunda extração orgânica com CIA. Após a centrifugação (13.000 RPM, por 5 min), a porção aquosa foi transferida para novos tubos, aos quais foram adicionados 50 µL de solução de CTAB 10% [CTAB 10%; NaCl 1,4 M], a 60°C. Após a homogeneização, realizou-se uma terceira extração orgânica com CIA. A porção aquosa foi precipitada pela adição de 2/3 do volume de álcool

isopropílico gelado (-20°C). O material foi mantido por 30 min a 20°C e, posteriormente, centrifugado a 7.000 RPM, por 5 min. O álcool isopropílico foi descartado e o DNA desidratado novamente com 1 mL de álcool etílico 95%. O material permaneceu por 10 min a -20°C e foi centrifugado a 8.000 RPM, por 5 min. O álcool etílico foi descartado e deixou-se o precipitado secar a temperatura ambiente. O DNA foi diluído em 100 µL de TE, a temperatura ambiente, por um período de 12 a 16 horas, e armazenado a - 20°C.

A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose a 1%, corado com GelRed®, e revelado sob luz ultravioleta.

### 3.2 ANÁLISE MOLECULAR

A análise molecular realizou-se através de reações em cadeia da polimerase (PCR), dois locos microssatélites foram avaliados. As temperaturas foram otimizadas com reação de pré-mix contendo volume final de 15µL. O pré-mix, para o loco Eun5, foi preparado com 1,33pMol de oligonucleotideos iniciadores, 0,03U de Taq DNA polimerase, 1,33mM de dNTP mix(10Mm), 2mM de MgCl (50 mM), 2X tampão de enzima 10X PCR Buffer [Tris-HCl pH 8,4 (20 mM), KCl (50 mM)], completando o volume 2,4 µL de água MilliQ®, 2,0 µL de Dna, para o loco Eun121, 1,33 pMol de oligonucleotideos iniciadores, 0,03 U de Taq Dna Polimerase, 1,33 mM de dNTP's, 3,33 mM MgCl, 1X tampão de enzima, 2,1 µL água, 3,0 de Dna. O programa de PCR foi otimizado, e o protocolo melhor adaptado possui 96°C por 4 min, com 30 ciclos de 96°C por 45 seg, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min, a extensão foi feita a 72°C por 10 min, para ambos os locos. As seqüências de oligonucleotideos iniciadores, ou primers, foram baseadas em Ramos et. al (2008).

### 3.3 CORRIDA ELETROFÉRICA

A avaliação da diversidade alélica da população foi realizada através de análise de géis de agarose a 3%, a partir do produto de PCR. Uma solução contendo 3 g de agarose em 100 ml de tampão TBE (tris-borato-EDTA) 1x foi preparada e dissolvida em forno microondas. A solução foi então vertida em uma cuba de acrílico horizontal, montada com pentes de acrílico para a formação de poços para posterior aplicação das amostras. Após a polimerização do gel, adicionou-se tampão TBE 1x e aplicou-se 4 µL

do produto de PCR com 3  $\mu\text{L}$  do corante GelRed®. Um marcador de peso molecular (ladder) 50pb (Concentração: 0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) , 4  $\mu\text{L}$  de ladder para 3  $\mu\text{L}$  de GelRed® foi utilizado para identificação do tamanho dos produtos da PCR amplificados. A eletroforese foi realizada normalmente a uma corrente elétrica de 90 volts, na qual os fragmentos de DNA (que são eletronegativos) migram por repulsão do pólo negativo para o pólo positivo da cuba eletroforética. Após aproximadamente 120 minutos de corrida eletroforética o resultado foi visualizado por transiluminação com luz ultravioleta. Com o auxílio do software GenAlex os dados foram avaliados e calculados *índice de endogamia(F)*, *heterozigosidade esperada(HE)* e *observada (HO)*.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tamanho dos alelos foi estimado em comparação visual com o marcador de peso molecular de DNA de 50pb. O loco Eun 121 apresentou 8 alelos com tamanho 205-215 pares de bases (Figura 3), *índice de endogamia F = 0.64*, *heterozigosidade observada Ho= 0,28*, e *heterozigosidade esperada He = 0.79*. O loco Eun5 apresentou 12 alelos com tamanho 140-160 pares de bases (Figura 4), *índice de endogamia F = 0.32*, *heterozigosidade observada Ho= 0.60*, *heterozigosidade esperada He = 0.88*.



Figura 3: Gel de agarose 3%, com amplificações do *primer* Eun121 na população de São Borja com marcador de 50Pb.

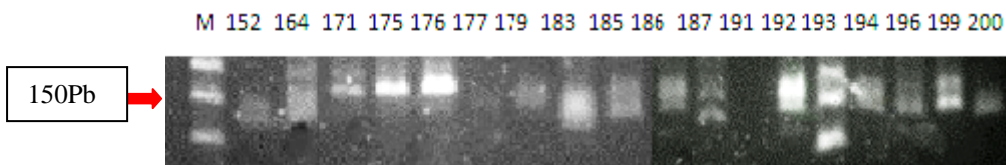
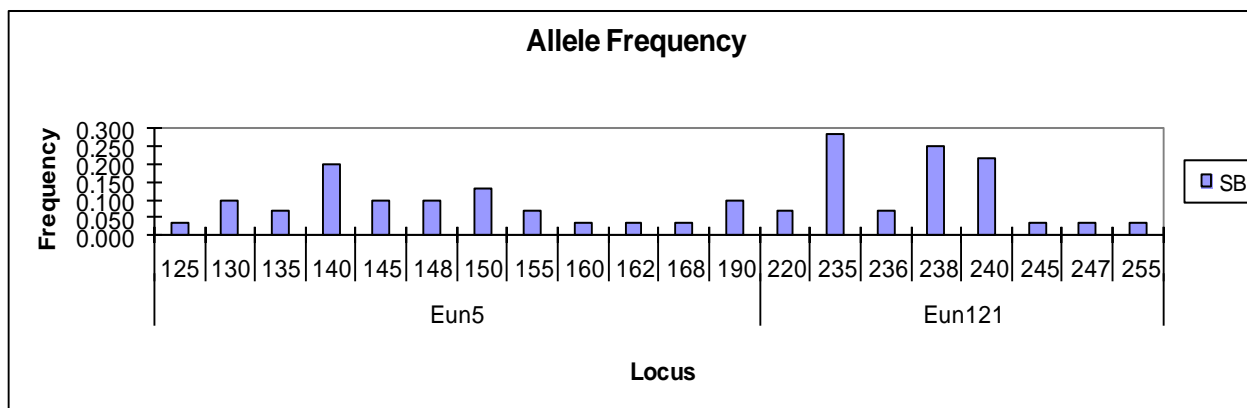


Figura 4: Gel de agarose 3%, com ampliações do *primer* Eun 5 na população de São Borja com marcador 50Pb.

A análise do software GenAlex indica que cinco alelos foram encontrados com maior frequência nos loci avaliados( Gráfico 1). Os alelos mais frequentes no loco Eun 5 os foram o 140 e 150, e no loco Eun121 os alelos mais frequentes foram 235, 238 e 240.

Gráfico 1: mostra a frequência de alelos para os loci Eun 5 e Eun121.



Os resultados obtidos, comparados a Ramos et. al (2008), mostra alta diversidade de alelos encontrados, *heterozigosidade observada*, *heterozigosidade esperada* e *índice de endogamia* (Tabela 1).

Tabela 1: Demonstra os valores de heterozigosidade observada, heterozigosidade esperada e índice de endogamia encontrados neste trabalho comparados a Ramos et. al (2008).

	Nº de plantas avaliadas	Alelos	Heterogositade Observada (Ho)	Heterozigosidade Esperada (He)	Índice de Endogamia (F)
<b>Loco Eun 5</b>					
Este trabalho	18	12	0.60	0.88	<b>0.32</b>
RP ( Ramos et. al 2008)	18	16	0.46	0.91	<b>0.48</b>
T (Ramos et. al 2008)	18	14	0.80	0.90	<b>0.11</b>
SJ ( Ramos et. al 2008)	18	16	0.50	0.91	<b>0.45</b>
<b>Loco Eun 121</b>					
Este trabalho	18	8	0.28	0.79	<b>0.64</b>
RP ( Ramos et. al 2008)	10	10	0.58	0.84	<b>0.31</b>
T (Ramos et. al 2008)	6	6	0.34	0.75	<b>0.53</b>
SJ ( Ramos et. al 2008)	7	7	0.22	0.74	<b>0.70</b>

O tamanho reduzido da população e o alto índice de endogamia podem ser decorrentes de cruzamentos entre indivíduos aparentados, a consequência desse evento torna-se inevitável após algumas gerações. Em outras palavras, o aumento de cruzamentos entre indivíduos aparentados, através de endogamia, pode causar isolamento da população e fixação de alelos. Isso ocorrerá em pequenos fragmentos, e afeta a densidade populacional, causando um Efeito Gargalo na diversidade genética da população, além da perda de adaptações benéficas que foram adquiridas, e perda de heterogositade. O efeito gargalo é resultante da deriva genética a qual atua alterando as frequências alélicas, e como os alelos que se perdem ou fixam-se são distintos, a deriva genética tende a diferenciar populações geneticamente.

As informações sobre reprodução, modo de polinização e dispersão de pólen e sementes desta espécie são escassas. A falta de conhecimento sobre esses processos também ocorre em outras espécies de Myrtaceae, além de outras espécies nativas do sul do país como a *Eugenia involucrata* (cerejeira-do-mato). Lughadha & Proença (1996), sustentam a hipótese que o padrão de floração de pitangueira é do tipo floração em massa, a qual é caracterizada por apresentar grande produção de flores em curtos

períodos de tempo, sugerindo uma maior ocorrência de cruzamentos entre indivíduos aparentados.

Entre as classes de marcadores existentes, os SRR (Sequências Simples Repetidas), ou marcadores microssatélites são os que se aproximam mais do marcador ideal para os estudos de genética de populações (Rafalski et al., 1996). Esses marcadores consistem de unidades de cerca de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem (em seqüência) dentro do genoma, as sequencias são caracterizadas por pares de iniciadores específicos (os primers). Embora sejam os mais indicados para estudos desse tipo, podem ocasionar desvantagens como bandas nulas, ou alelos nulos. Alelos nulos aumentam o número de indivíduos supostamente homozigotos, visto que apenas um dos alelos amplifica em caso de plantas heterozigotas para o alelo nulo. Existem fortes indícios da segregação de alelos nulos nesses locos (Carvalho et al., 2010).

Existem alguns fatores os quais ameaçam a conservação de biodiversidade, decorrente da ação antrópica no ambiente, como fragmentação de habitats, introdução de espécies exóticas, e a crescente utilização de monoculturas e pecuária, que ocorre em grande escala na região do Pampa. A monocultura acarreta várias desvantagens, pois é um plantio extensivo de um único vegetal que substitui a cobertura original, e geralmente possui grande diversidade de plantas. Desse modo, é uma prática danosa ao solo, pois é exaurido ao longo do tempo, ocasionando a perda da biodiversidade.

Mudanças climáticas afetam a diversidade genética, segundo as estimativas das taxas de extinção decorrentes das mudanças climáticas são, de fato, alarmantes (Malcom et al., 2006). Assim, poderão ocasionar a perda de variações genéticas entre as populações de uma espécie como entre os indivíduos de uma população.

Considerando o reduzido tamanho da população, pode-se afirmar que a população possui alto nível de diversidade genética em ambos os locos. Estudos previamente realizados por nosso grupo (Costella et al., 2013) mostram que uma exploração altamente predatória vem sendo adotada nas florestas nativas da região da Fronteira Oeste do RS em virtude da explosão demográfica e expansão das fronteiras agrícolas, comprometendo o patrimônio dos ecossistemas devido à deterioração da base genética.

## 5. CONCLUSÃO

Dessa forma, os resultados obtidos nesse trabalho, indicam a necessidade de conservação dessa espécie no Pampa gaúcho, considerando o relativamente alto índice de diversidade genética (número de alelos e  $H_e$ ) e a provável ocorrência de cruzamentos entre indivíduos aparentados.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E.C., KARNIKOWSKI, M.G.O., FLETO, R.,BALDISSEROTTO, B. **Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popupal medicine.** Rev. Saúde Pública, 1995.

ALVES E.S.; TRESMONDI F.; LONGUI E.L, **Análise estrutural de folhas de Eugenia uniflora L. (Myrtaceae) coletadas em ambientes rural e urbano, SP, Brasil,** Acta Bot. Bras, 2008.

BEZERRA, J.E.F.; SILVA JUNIOR, J.F da; LEDERMAN, I.E. **Pitanga( Eugenia uniflora L.),** Jabotical:Funep, 2000.

BORÉM e CAIXETA, **Marcadores Moleculares,** 1 Ed. São Paulo: Lorena, 2009.

CARVALHO A.C. M. de; FREITAS M.L.M.; MORAES S.M.B. de; MORAES M.L.T de; STRANGHETTI V.; ALZATE-MARIN A.L.; SEBBENN A.M., **Diversidade genética, endogamia e fluxo gênico em pequena população fragmentada de Copaifera langsdorffii ,** 2010.

CLARK A.G.; HARTL D.L., **Princípios de Genética de Populações,** 4 Ed. São Paulo: Artmed, 2010 .

COSTELLA E.; GARCIA B.A.; COSTA L.S.C da.; CORNELEO N.S da.; SCHÜNEMANN A.L.; STEFENON V.M.; **Anthropogenic use of gallery forests in the Brazilian Pampa,** Acta Scientiarum, 2013.

DONADIO L. C; MORO F.V.; SERVIDONE A. A, **Pitanga. In: Frutas Brasileiras. Novos Talentos, Jaboticabal,** 2002.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. 1990. **Isolation of plant DNA from fresh tissue.** Focus, 12.

FERREIRA, M.E.; MORETZSOHN, M.C.; BUSO, G.S.C. **Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal**, Recursos genéticos vegetais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

FERREIRA-RAMOS R.; LABORDA P. R.; SANTOS M. O.; MAYOR M.S.; MESTRINER M.A.; SOUZA A.P.; ALZATE-MARIN A.L. **Genetic analysis of forest species *Eugenia uniflora* L. throughof newly developed SSR markers**. Conserv Genet, 2008.

FIGUEIREDO R. W.; LAJOLO F.M.; ALVES R. E.; FILGUEIRAS A C.; **Physical - chemical changes in early dwarf cashew pseudofruits during development and maturation**. Food Chemistry, 2002

FRANZON R.C.; CASTRO C.M.; RASEIRA M.C.B.; **Variabilidade genética em populações de pitangueira oriundas de autopolinização livre acessada por AFLP**, 2010.

GRIME J.P, **Benefits of plant diversity to ecosystems: immediate, filter and founder effects**, 1998.

JOLY, A.B, **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**, 4 ed., São Paulo, Companhia Editora Nacional,1977.

LIMA, V. L. G.; MELO, E. A.; LIMA, D. E . S.; **Fenólicos e Carotenóides totais em pitanga**, Sci. Agric., 2002.

LUGHADHA, E.N. & PROENÇA, C.; **A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae)**, Annals of the Missouri Botanical Garden, 1996.

MALCOM, J.R.; LIU C.; NEILSON R.P.; HANSEN L.; HANNAH L., **Global warming and extinctions of endemic species from biodiversity hotspots**. Conservation Biology, 2006

NOGUEIRA L.R.; BÜTTOW M. V.; CASTRO C. M.; COSTA R. R. da;  
DEGENHARDT J. ,**Avaliação da diversidade genética entre seleções**  
***Eugenia uniflora* L. através da análise de AFLP**, 2008.

PILLAR V.D.P.; MÜLLER S.C.; CASTILHOS Z.M. S.; JACQUES A.V.A.; **Campus**  
**Sulinos, conservação e uso sustentável da biodiversidade**, 2 Ed, Brasília: MMA ,  
2009 .

RAFALSKI J.A; VOGEL J.M; MORGANTE M., POWELL W., ANDRE C E  
TINGEY S.V; **Generating and using DNA markers in plants. In: Non Mammalian**  
**Genomic Analysis: a Practical Guide** (eds Birren B, Lai E), Academic Press, New  
York, 2006.

RIBEIRO A. V; SOUSAV. de; **Oportunidades de Investimentos na Paraíba.**  
**Secretário de Agricultura/PB**, 1998.

ROESCH L.F.W.; Vieira F.C.B.; PEREIRA V. A.; SCHÜNEMANN A.L.; TEIXEIRA  
I.F.; SENNA A.J.T.; and STEFENON V.M., **The Brazilian Pampa: A Fragile Biome**,  
2009.

SILVA A. L.G da; PINHEIRO M.C.B.; **Biologia floral e da polinização de quatro**  
**espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae)**, Acta Bot., 2007.

SIQUEIRA T.; PADIAL A.A.; Luis Mauricio BINI L.M.; **Megadiversidade** , dez.  
2009, 5v.

SOUZA, V.C. e LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para**  
**identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG**  
**II. Plantarum**, Nova Odessa, 2005.

Biomás brasileiros. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br>> Acesso em: 23 jan.  
2013.

Pitanga. Disponível em: <[wikipedia.org/wiki/Pitanga](http://wikipedia.org/wiki/Pitanga)> Acesso em: 20 nov. 2011.