

SELEÇÃO DE PRIMERS RAPD PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *AECHMEA RAMOSA* (BROMELIACEAE) OCORRENTES NO DISTRITO DE BURARAMA, MUNICÍPIO DE CACHOEIRO DE ITAPEMIRIM-ES

Favoreto, F. C.¹, Couto, D. R.², Nogueira, E. U.¹, Miranda, F. D.¹, Soares, T. C.¹, B Lima,
A. B. P.¹

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Produção Vegetal, Alto Universitário s/n,
Guararema, Alegre, ES, fernadafavoreto@hotmail.com

²Bioecos Consultoria Ambiental. Alegre, ES, dayvidcouto@hotmail.com

Resumo- A família Bromeliaceae se destaca tanto econômica quanto ecologicamente, porém a destruição de habitats e exploração para fins ornamentais tem colocado em risco suas populações. O conhecimento da estrutura genética de populações é etapa fundamental para a realização de programas conservacionistas e os marcadores RAPD têm se mostrado adequados para estudos de populações naturais, porém, inicialmente, é necessário estabelecer métodos de extração de DNA e selecionar os *primers* mais polimórficos. Com este objetivo, foram testados diferentes formas de conservação do material e protocolos de extração de DNA, e 100 *primers* RAPFD. A utilização de material vegetal fresco ou conservado em geladeira por até 48 horas em combinação com o método modificado de Doyle e Doyle (1990) resultam em DNA de boa qualidade para amplificação via RAPD. Dos 100 *primers* testados, 63 amplificaram em *A. ramosa*. Destes 13 apresentaram de 5 a 11 bandas polimórficas cada um e foram pré-selecionados totalizando 99 bandas, sendo 80 polimórficas, o que representa aproximadamente 80,8 % de polimorfismo.

Palavras-chave: Diversidade Genética, Bromeliaceae, *Aechmea ramosa*, marcador RAPD

Área do Conhecimento: Ciências Agrárias

Introdução

Nas últimas décadas, o interesse sobre a família Bromeliaceae tem aumentado significativamente (VERSIEUX; WENDT, 2007), uma vez que suas espécies se destacam tanto pelo valor econômico, sendo utilizadas na agricultura, ornamentação e indústria (MANETTI et al., 2009), quanto pela importância ecológica, pois atuam como espécies chave para manutenção da diversidade biológica (BENZING, 2000, GILBERT, 1980). O potencial ornamental da família é um dos aspectos mais visados, sendo explicado pelo exotismo, beleza e resistência dessas plantas, que não exigem muitos cuidados em seu cultivo (CARVALHO; MERCIER, 2005).

O gênero *Aechmea* se destaca como o maior, mais polimórfico e problemático taxonomicamente dentro da Subfamília Bromelioideae (FARIA, 2006), com centros de diversidade e endemismo em áreas de Floresta Atlântica brasileira (BENZING, 2000) e grande interesse ornamental (CARVALHO; MERCIER, 2005). *Aechmea ramosa* é endêmica da Mata Atlântica dos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia (MARTINELLI et al., 2008). Martinelli et al. (2008) identificaram o estado do Espírito Santo como o segundo maior em riqueza de espécies e endemismos para a família Bromeliaceae na

Floresta Atlântica, listando a ocorrência de 276 espécies neste bioma. Dentre as principais causas do decréscimo das populações de Bromeliaceae no Espírito Santo destacam-se a perda de habitats naturais devido a fragmentação da Floresta Atlântica (SIMONELLI et al., 2007) e a pressão extrativista causada pelo interesse ornamental sobre a família (KOLLMANN et al., 2007), aliado ao pouco conhecimento técnico-científico sobre as bromeliaceas dificultando a sua produção comercial (NEGRELLE; MURARO, 2006). A preservação da diversidade genética se tornou o objetivo da maioria dos programas de conservação, e conhecer a distribuição desta diversidade entre e dentro de populações naturais é o primeiro passo (BEKESSY et al., 2002). O conhecimento do modo como a variação genética de uma espécie está distribuída entre e dentro de suas populações é essencial para a sua conservação. Atualmente, o conhecimento da estrutura genética de populações é entendido como etapa fundamental para a realização de programas conservacionistas (MAMURIS et al., 2001; MARTINS, 1988, SHARMA et al., 2000).

Segundo Silveira et al. (2009), entre os marcadores moleculares conhecidos, o RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), técnica desenvolvida por Williams et al. (1990), mostra-se como uma ferramenta útil para a análise da diversidade genética molecular em populações

naturais de plantas. Isto se deve ao fato de utilizar iniciadores (*primers*) aleatórios para a reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), dispensando o conhecimento prévio sobre o genoma da espécie (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). A diferenciação de indivíduos é feita pelo padrão de presença e ausência de bandas no gel que representariam alelos gênicos, mas não há diferenciação entre indivíduos homocigotos e heterocigotos para os referidos alelos, sendo por isso chamado marcador molecular dominante (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Porém o fato de poder ser utilizado em espécies nunca antes estudadas, a exigência de pequenas quantidades de DNA e recursos financeiros o habilita para estudos em diversas espécies de plantas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998) e vem sendo utilizado com sucesso em Bromeliaceae (CAVALLARI, 2004; COSTA et al., 2002; SILVEIRA et al., 2009; PAMPONÉT et al., 2008). No entanto, inicialmente deve ser estabelecido um protocolo adequado para extração de DNA vegetal das amostras para permitir a realização de PCR visando à seleção de *primers* mais polimórficos.

Até o momento, nenhuma pesquisa foi publicada com o uso de marcadores moleculares para estimar a diversidade genética em populações de *A. ramosa*. O objetivo deste trabalho foi padronizar um protocolo de extração de DNA de forma a selecionar *primers* RAPD capazes de detectar polimorfismo para esta espécie.

Metodologia

O distrito de Burarama possui área aproximada de 90 Km² e situa-se no município de Cachoeiro de Itapemirim, ao sul do estado do Espírito Santo, nas coordenadas geográficas 20°41'S 41°21'W.

Com o objetivo inicial de estabelecer os melhores métodos de conservação do material vegetal e de extração de DNA, inicialmente foram utilizadas folhas de um espécime de *A. ramosa* mantido em casa de vegetação.

As folhas foram coletadas inteiras e lavadas em água corrente, posteriormente limpas com álcool 70%, enxaguadas em água destilada e então segmentadas. Para verificar a influência do método de conservação do material vegetal sob o processo de extração de DNA (qualidade, concentração e duração do processo) foram realizados ensaios nas seguintes condições: material fresco ou armazenado por 24h ou 48h em geladeira (4 °C) ou congelador (-18 °C). Todas as combinações de conservação foram avaliadas com dois métodos de extração de DNA: Doyle e Doyle (1990) – “protocolo longo: aproximadamente 60 horas” e Doyle e Doyle (1990) modificado por

Abdelnoor et al. (1995) – “protocolo curto aproximadamente 36 horas”. O protocolo Doyle e Doyle (1990) modificado apresenta somente uma repetição das etapas de desproteção com clorofórmio-álcool isoamílico, de precipitação overnight (NaCl₂ 5 M e isopropanol gelado) e de lavagens do pellet com etanol gelado.

Durante as expedições ao campo, foram coletadas folhas jovens de 30 indivíduos de *A. ramosa* em três fragmentos de Mata Atlântica em locais públicos da área de estudo. Para evitar a dupla amostragem de um mesmo *genet* foi coletado somente um indivíduo por agrupamento (touceira) com distância mínima de dois metros entre cada roseta amostrada. Cada roseta coletada foi identificada com placas metálicas numeradas. No laboratório foi realizada a limpeza das folhas conforme mencionado anteriormente e estas foram imediatamente submetidas à extração ou mantidas em geladeira (4°C) por até 48h. A extração de DNA foi feita segundo o protocolo modificado de Doyle e Doyle (1990), com oito repetições, reduzidas a metade na etapa de recolhimento do sobrenadante da primeira centrifugação. A quantificação e verificação da qualidade de DNA foram realizadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%, contendo 0,02 uL mL⁻¹ de brometo de etídeo em tampão SB (0,04% v/v de NaOH e 0,25% v/v de ácido bórico), utilizando um padrão de DNA de concentração conhecida para comparação (DNA de vetor lambda com 50ng, 75ng e 100ng).

Inicialmente foram testados 100 *primers* RAPD da empresa Operon Technologie em oito de indivíduos escolhidos nos três locais coletados para pré-seleção dos *primers* mais polimórficos. Destes, 35 foram escolhidos por já mostrarem amplificação em outra espécie da família, *Pitcairnia flammaea* (NOGUEIRA, 2010). As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25 µL, contendo MgCl₂ (2,4 mM), Tris KCl pH 8.3 (10 mM/50 mM), dNTP (0,15 mM de cada nucleotídeo), 0,4 µM de *primer*, 1 unidade de Taq polimerase e cerca de 40 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador (Thechne TC 412) nas seguintes condições: 3 minutos a 94 °C, seguido de 40 ciclos constituídos por três etapas: a) 30 segundos a 94 °C, b) 30 segundos a 35 °C e c) 1 minuto a 72 °C, e uma etapa final de 3 minutos a 72 °C.

Os fragmentos amplificados de RAPD foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, contendo 0,02 uL mL⁻¹ de brometo de etídeo em tampão SB, a 100 volts por aproximadamente três horas. Em todas as corridas foi utilizado o marcador de peso molecular Gene Ruler 100 pb DNA ladder Plus (Fermentas Life Sciences). Terminada a corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Resultados

Os testes realizados para padronização do melhor método para conservação das folhas e extração de DNA mostraram que o protocolo curto, Doyle e Doyle (1990) com as modificações de Abdelnoor et al. (1995), resultaram em uma maior concentração de DNA extraído, independente do método e tempo de armazenamento. Observa-se também uma redução na quantidade de DNA extraído em amostras armazenadas em congelador por 48 horas (Figura 1).

Nos demais tratamentos foram obtidos DNA de boa qualidade com concentração entre 25 a 40 ng/µl. Para todas as extrações de DNA de *A.*

ramosa foram então padronizadas a utilização de folhas frescas ou armazenadas por até 48 h em geladeira e do protocolo Doyle e Doyle (1990) modificado. De 100 *primers* RAPD testados, 63 amplificaram em *A. ramosa*, destes 13 apresentaram de 5 a 11 bandas polimórficas cada um (*primers* 1 a 13 - Tabela 1), 44 *primers* apresentaram de 1 a 4 bandas polimórficas por *primer* (*primers* 14 a 57 - Tabela 1) e 6 *primers* apresentaram somente bandas monomórficas (*primers* 58 a 63 – Tabela 1). Os treze *primers* mais polimórficos pré-selecionados geraram 99 bandas das quais 80 foram polimórficas, o que representa 80,8 % de polimorfismo.

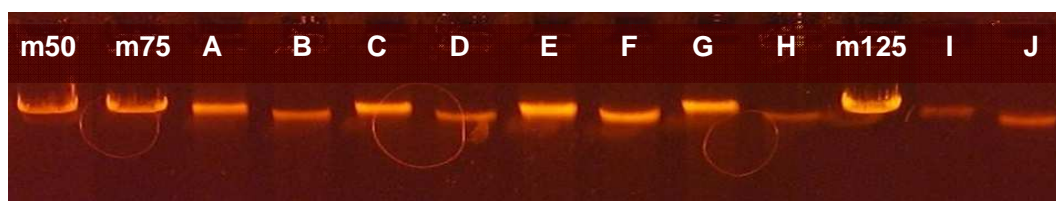


Figura 1: Comparação entre diferentes métodos de conservação de material vegetal de *A. ramosa* e protocolo de extração de DNA: material fresco, armazenado em geladeira (4°C), armazenado em congelador (-18°C); tempo de armazenamento (24 ou 48 horas) e protocolo de extração de DNA (Doyle e Doyle (1990) modificado (prot. Curto) e Doyle e Doyle (1990) (prot. longo). A-B: folhas frescas, A: prot. curto, B: prot. longo. C-F: armazenamento em geladeira, C: 24h /prot. curto, D: 24h/prot. longo, E: 48h /prot. curto, F: 48h /prot. longo. G-J: Armazenamento em congelador, G: 24 h/prot. curto, H: 24h/ prot. longo, I: 48h/prot. curto, J: 48h/ prot. longo. As canaletas indicadas por m50, m75 e m125 representam, respectivamente, marcador de concentração contendo 50 ng, 75 ng e 125 ng de DNA.

Tabela 1: *Primers* RAPD testados em *A. ramosa*

<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'	Nº de bandas amplificadas	Nº de bandas polimórficas	% de polimorfismo	Tamanho (pb)
1. OPG 17	ACGACCGACA	12	12	100,00	400-1300
2. OPE 14	TGCGGCTGAG	11	11	100,00	200-1100
3. OPAC 19	AGTCCGCCTG	10	10	100,00	900-1100
4. OPW 07	CTGGACGTCA	9	8	88,89	400-1300
5. OPAH 19	GGCAGTTCTC	8	7	87,50	400-1400
6. OPH 18	GAATCGGCCA	7	7	100,00	400-1000
7. OPR 07	ACTGGCCTGA	8	6	75,00	500-1400
8. OPZ 14	TCGGAGGTTC	6	6	100,00	1200-1300
9. OPAL 06	AAGCGTCCTC	7	5	71,43	600-1200
10. OPAI 08	AAGCCCCCA	6	5	83,33	300-1000
11. OPAL 08	GTCGCCCTCA	5	5	100,00	300-1100
12. OPC 05	GATGACCGCC	5	5	100,00	300-600
13. OPAT 14	GTGCCGCACT	5	5	100,00	600-1300
14. OPAL 17	CCGCAAGTGT	6	4	66,67	300-1100
15. OPAD 08	GGCAGGCAAG	6	4	66,67	300-1200
16. OPS 07	TCCGATGCTG	5	4	80,00	500-1100
17. OPG 02	GGCACTGAGG	5	4	80,00	500-1100
18. OPQ 13	GGAGTGGACA	5	4	80,00	500-1400

Tabela 1: Continuação

<i>Primer</i>	<i>Sequência 5'-3'</i>	Nº de bandas amplificadas	Nº de bandas polimórficas	% de polimorfismo	Tamanho (pb)
19. OPQ 06	GAGCGCCTTG	4	4	100,00	700-1100
20. OPE 15	ACGCACAACC	4	4	100,00	600-1100
21. OPAL 16	CTTTTCGAGGG	6	3	50,00	300-1200
22. OPC 11	AAAGCTGCGG	6	3	50,00	200-1300
23. OPAT 11	CCAGATCTCC	6	3	50,00	400-1200
24. OPQ 03	GGTCACCTCA	5	3	60,00	1400-1100
25. OPH 15	AATGGCGCAG	5	3	60,00	300-1200
26. OPK 01	CATTCGAGCC	5	3	60,00	700-1200
27. OPAT 15	TGACGCACGG	5	3	60,00	600-1200
28. OPAL 20	AGGAGTCGGA	5	3	60,00	200-1100
29. OPAH 13	TGAGTCCGCA	5	3	60,00	700-1200
30. OPQ 04	AGTGCGCTGA	4	3	75,00	600-1300
31. OPAL 05	GACTGCGCCA	4	3	75,00	600-1200
32. OPY 17	CACGTGGTGA	4	3	75,00	500-1100
33. OPAH 06	GTAAGCCCCT	3	3	100,00	1000-1200
34. OPQ 05	CCGCGTCTTG	3	3	100,00	500-1100
35. OPBF 14	CCGCGTTGAG	3	3	100,00	900-1300
36. OPH 07	CTGCATCGTG	5	2	40,00	400-1200
37. OPAA 03	TTAGCGCCCC	4	2	50,00	800-1400
38. OPAT 03	GACTGGGAGG	4	2	50,00	1000-1200
39. OPAF06	CCGCAGTCTG	4	2	50,00	300-1200
40. OPAT 13	CTGGTGGAAG	4	2	50,00	1000-1200
41. OPAB 19	ACACCGATGG	4	2	50,00	600-1300
42. OPAH 02	CACTTCCGCT	4	2	50,00	1100-1400
43. OPH 04	GGAAGTCGCC	4	2	50,00	700-1300
44. OPW 06	AGGCCCGATG	3	2	66,67	700-1200
45. OPAL 04	ACAACGGTCC	3	2	66,67	800-1200
46. OPQ 20	TCGCCCAGTC	3	2	66,67	700-1200
47. OPG 13	CTCTCCGCCA	3	2	66,67	400-1100
48. OPU 02	CTGAGGTCTC	3	2	66,67	300-1300
49. OPQ 09	GGCTAACCGA	3	2	66,67	900-1200
50. OPAE 02	TCGTTACCCC	3	2	66,67	600-1000
51. OPQ 01	GGGACGATGG	2	2	100,00	1000-1200
52. OPG 12	CAGCTCACGA	4	1	25,00	1100-1300
53. OPH 16	TCTCAGCTGG	3	1	33,33	500-800
54. OPT 15	GGATGCCACT	3	1	33,33	200-700
55. OPAG 07	CACAGACCTG	3	1	33,33	500-1200
56. OPN 20	GGTGCTCCGT	2	1	50,00	500-1000
57. OPG 04	AGCGTGCTG	2	1	50,00	1000-1200
58. OPP 08	ACATCGCCCA	4	0	0,00	500-1200
59. OPW 20	TGTGGCAGCA	3	0	0,00	600-1300
60. OPQ 14	GGACGCTTCA	2	0	0,00	900-1200
61. OPG 16	AGCGTCCTCC	2	0	0,00	800-1100
62. OPAH 12	TCCAACGGCT	2	0	0,00	700-1300
63. OPS 11	AGTCGGGTGG	1	0	0,00	1000

Discussão

Os melhores resultados obtidos com o protocolo curto podem ser explicados pela possível perda de DNA durante a desproteção e lavagens extras presentes no protocolo original de Doyle e Doyle (1990).

Em trabalhos realizados com outras espécies da família Bromeliaceae, foi verificada grande variação em relação ao número de bandas polimórficas amplificadas por RAPD e altas taxas de polimorfismo.

Cavallari (2004) estudando três espécies do gênero *Encholirium* (Bromeliaceae) testou 96 *primers* RAPD e selecionou 16 *primers* que geraram em média 59 bandas para cada espécie das quais, aproximadamente, 55,3 eram polimórficas. Costa et al. (2002) estudando acessos de *Ananas erectifolius* (Bromeliaceae) utilizaram 7 *primers* RAPD que geraram 104 bandas, das quais 79 eram polimórficas. PAMPONÉ et al. (2008) para estudos de diversidade genética em *Lymania azurea* (Bromeliaceae) utilizaram 10 *primers* RAPD e obtiveram 48 bandas polimórficas. NOGUEIRA (2010) estudando populações naturais de *P. flammea* utilizou 8 *primers* RAPD que geraram um total de 55 bandas e destas 41 foram polimórficas. SILVEIRA et al. (2009) estudando acessos de *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae) utilizaram 36 *primers* RAPD que geraram 501 bandas sendo 467 polimórficas. Assim, o número de bandas polimórficas amplificadas por RAPD em *A. ramosa* estão de acordo com dados encontrados na literatura.

Conclusão

Foi estabelecida como melhor condição para extração de DNA de *A. ramosa* a utilização de folhas frescas ou armazenadas por até 48 h em geladeira e do protocolo Doyle e Doyle (1990) modificado.

Os *primers* RAPD OPE 14, OPG 17, OPAC 19, OPAH 19, OPW 07, OPH 18, OPR 07, OPZ 14, OPAL 06, OPAL 08, OPAI 08, OPC 05, OPAT 14 se mostraram mais eficientes para estudos de diversidade genética em *A. ramosa* por apresentarem maior nível de polimorfismo, com amplificação de 99 bandas das quais 80 foram polimórficas, o que representa 80,8 % de polimorfismo.

Referências

ABDELNOOR, R.V.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within

Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 18, n. 2, p. 265-273, 1995.

BENZING, D. H. **Bromeliaceae**: Profile of an Adaptive Radiation. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 2000. 690 p.

BEKESSY, S. A. ALLNUTT, T. R., PREMOLI, A. C., LARA, A., ENNOS, R. A. BURGMAN, M. A., CORTES, M. & NEWTON, A. C. Genetic variation in the vulnerable and endemic Mokey Puzzle tree, detected using RAPDs. **Heredity**, 88, 243-249, 2002.

CARVALHO, A. C. P. P.; MERCIER, H. Bromeliaceae. In: EMBRAPA.; TERAQ, D.; CARVALHO, A. C. P. P.; BARROSO, T. C. S. F. (Ed.). **Flores Tropicais**: Tropical flowers. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 225 p.

CAVALLARI, M. M. **Estrutura genética de populações de *Encholirium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação**. 2004. 92p. Dissertação (mestrado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

COSTA, M. R.; LAMEIRA, O. A.; YOSHINO, V. C. Caracterização genética do curauá (*Ananas erectifolius*) através de Marcadores RAPD. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.5, p.28-30, 2002.

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

FARIA, A. P. G. **Revisão taxonômica de filogenia de *Aechmea* Ruiz & Pav. subg. *Macrochordion* (De Vriese) Baker, Bromelioideae – Bromeliaceae**. 2006.199 p. Tese (Doutorado): Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2006.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares**

em análise genética. 3 ed. Brasília: CENARGEM-EMBRAPA, p. 220, 1998.

GILBERT, L.E. Food web organization and the conservation of Neotropical diversity. In: SOULE, M.E.; WICOX, B.A. (Eds.). **Conservation Biology: an evolutionary perspective**. Massachusetts: Sinauer Press, 1980.

KOLLMANN, L. J. C. et al. As Angiospermas ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo. In: Fraga, C. N. & Simonelli, M. (Eds.). **Espécies da flora ameaçadas de extinção no estado Espírito Santo**. Vitória: IPEMA, 2007, p. 105-137.

MANETTI, L. M.; DELAPORTE, R. H.; LAVERDE, A. Metabólitos Secundários Da Família Bromeliaceae. **Quim. Nova**, v. 32, n. 7, p.1885-1897, 2009.

MARTINELLI, G. et al. Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, n. 59, v. 1, p. 209-258, 2008.

MAMURIS, Z.; SFOUGARIS, A.I.; STAMATIS, C. Genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations as revealed by mtDNA RFLP-PCR analysis: implications for conserving genetic diversity. **Biological Conservation**, v.101, p.187-196, 2001.

MARTINS, P. S. Preservação e genética evolutiva. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS. Jaboticabal, 1988. **Anais...** Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 1988. P. 62-66.

NEGRELE, R. R. B.; MURARO, D. Aspectos fenológicos e reprodutivos de *Vriesea incurvata* Gaudich (Bromeliaceae). **Acta Sci. Biol. Sci.** Maringá, v. 28, n. 2, p. 95-102, April/June, 2006.

NOGUEIRA, E. U. 2010. **Caracterização de *Pitcairnia flammea* (Bromeliaceae), ocorrentes em fragmentos de Mata Atlântica, por meio de ferramentas biotecnológicas**. Dissertação de mestrado.

Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES.

PAMPONÉT, V. C. C.; FONTOURA, T.; GAIOTTO, F. A. Diversidade clonal em populações de *Lymania azurea* (Bromeliaceae) detectada através de marcadores RAPD. In: **Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética**. Salvador, BA, 2008.

SHARMA A., SHARMA R., MACHII H. 2000. Assessment of genetic diversity in *Morus* germplasm collection using fluorescence-based AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 101, 1049–1055.

SILVEIRA, D. G., AMORIM, E. P., JESUS, O. N. DE, SOUZA, F. V. D., PESTANA, K. N., SANTOS, V. J. DOS; SANTANA, J. R. F. de. **Variabilidade genética de populações naturais de caroá por meio de marcadores RAPD**. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.44, p.283-290, 2009.

SIMONELLI, M., FRAGA, C. N.; FERNANDES, H. Q. B. Situação atual da flora ameaçada no Estado do Espírito Santo. In: FRAGA, C. N.; SIMONELLI, M. (Eds.). **Espécies da flora ameaçadas de extinção no estado Espírito Santo**. Vitória: IPEMA, 2007, p. 17-20.

VERSIEUX, L. M.; WENDT, T. Bromeliaceae diversity and conservation in Minas Gerais state, Brazil. **Biodivers Conserv.** n. 16, p. 2989–3009, 2007.

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