

A essência do *Arbutus unedo* – Caracterização morfológica e genética do medronheiro de Castelo de Paiva

Arbustus unedo essence - morphological and genetic characterization of the strawberry tree of Castelo de Paiva

Ana Catarina Soares Madeira, Ana Cristina Teixeira da Rocha Duarte, Ana Margarete Vieira Gomes, Cristiana Sofia Martins Vieira, Helena Isabela Pereira Fernandes, Joana Cristina da Rocha Fernandes, João Carlos Gomes Oliveira Silva, Liliana Filipa Ferreira Andrade, Lígia Maria Costa Ferreira, Luís Miguel Espincho Duarte da Cunha Maioto, Miguel Nunes Carvalho, Paula Cristina Paiva da Rocha, Ricardo Jorge Teixeira Rodrigues, Ricardo Jorge Martins Santos, Rui Miguel Costa Carmo, Rui Miguel Pinto Cardoso, Sara Catarina Nunes da Silva Santos, Sara Cristina Martins Barbosa, Sílvia Mariana Matos Silva, Tânia Andreia Moreira de Sousa, Vânia Andreia Gonçalves dos Santos

Prof. Marco Aurélio Machado Cardoso

Agrupamento de Escolas de Castelo de Paiva
marcoamcardoso@gmail.com

Resumo

O medronheiro é um arbusto da região mediterrânica que pode ser encontrada por todo o país. Ao contrário do que verifica na região sul do país, no concelho de Castelo de Paiva é atribuída uma reduzida importância económica a esta espécie. Com o intuito de preservar e potenciar a produção desta espécie e contribuir para a dinamização da economia do concelho, procedeu-se à caracterização morfológica e genética de uma amostra da população de medronheiros de Castelo de Paiva. A caracterização morfológica e genética foi realizada para um total de 10 genótipos. Para tal recolheram-se 70 folhas aleatoriamente em cada árvore. Em 40 folhas mediu-se o comprimento, largura, comprimento do pedúnculo, peso fresco, peso seco e determinou-se a área foliar. Dos caracteres morfológicos analisados, aqueles que se revelaram mais úteis na distinção dos vários genótipos foram: comprimento do pedúnculo, peso fresco e peso seco. As restantes 30 folhas foram utilizadas para a caracterização genética. Esta caracterização foi realizada recorrendo a um marcador de DNA, ISSR. Os 5 primeiros exemplares utilizados na técnica de ISSR demonstraram-se polimórficos. Os resultados da caracterização genética sugerem que a variabilidade genética na população é média a alta.

Palavras-chave: *Arbutus unedo* L., diversidade genética, ISSR, conservação

Abstract

The strawberry tree is a shrub native in the Mediterranean region and it can be found throughout Portugal. Unlike the case in the southern region of the country, in Castelo de Paiva a minor economic importance is given to this species. In order to preserve, to enhance the production of this species and to contribute to the boosting of the economy of the region, we proceeded to the characterization of a small sample population of this fruit tree of Castelo de Paiva in what concerns to its morphology and genetics. The morphological and genetic characterization was performed for a total of 10 genotypes. For this, 70 leaves were randomly collected from each tree. For 40 leaves, it was measured the length, the width, the peduncle length, the wet weight, the dry weight and determined the leaf area. Of the morphological characteristics analyzed, the ones that

proved most useful in distinguishing the various genotypes were: the length peduncle, the wet weight and the dry weight. The remaining 30 leaves were used in the genetic characterization. This characterization was performed using a DNA marker, the ISSR. The 5 primers used in the ISSR technique proved to be polymorphic. The results from the genetic characterization suggest that variability in population genetics is medium to high.

Keywords: *Arbutus unedo* L., genetic diversity, ISSR, conservation

INTRODUÇÃO

O medronheiro (*Arbutus unedo* L.) é uma espécie frutífera, tipicamente mediterrânica, pertencente à família Ericaceae e ao género *Arbutus*. Em Portugal, esta espécie pode ser encontrada por todo o país. Contudo, a maior concentração verifica-se nas Serras do Caldeirão e Monchique (Algarve) (Pedro, 1994). Na maioria das regiões de ocorrência, o medronheiro apresenta uma elevada importância ambiental, económica, ornamental e medicinal. O seu fruto é transformado em diversos produtos alimentares tais como geleias e compotas, licores e aguardente. Às suas folhas são atribuídas propriedades diuréticas, antissépticas das vias urinárias e laxantes (Sá, 2010).

No concelho de Castelo de Paiva, contudo, é atribuída ao medronheiro uma reduzida importância económica, ao contrário do que se verifica em outras regiões do país. Para além disto, dispõe-se de pouca informação relativamente à distribuição geográfica desta espécie, o estado de conservação e à variabilidade do seu património genético. Assim sendo é importante caracterizar, morfológicamente e geneticamente, diferentes populações do concelho.

A caracterização morfológica de uma espécie, baseia-se no facto de existirem caracteres que permitem determinar a sua identidade, uniformidade e estabilidade. Trata-se de uma metodologia utilizada, por exemplo, no processo de proteção legal de uma nova espécie a cultivar ou de uma espécie em perigo (Sá, 2010). Porém, este tipo de caracterização apresenta alguns constrangimentos, nomeadamente: apresentam diferentes graus de interação com o ambiente e podem depender de um ou vários genes (Costa, 2010).

A caracterização genética de espécies é feita através de marcadores de DNA. Genericamente, entende-se por marcador de DNA, uma região do genoma que apresenta variação entre indivíduos (polimorfismo) (Diogo, 2011). Estes marcadores são ferramentas muito úteis no estudo de genomas, pois detetam polimorfismos diretamente no DNA, não sofrem influência ambiental e são independentes do estágio de desenvolvimento da planta (Silva, Alves, Martins,

Melo & Carvalho, 2011). Atualmente existem vários tipos de marcadores de DNA, sendo o ISSR (*inter simple sequence repeat*) um exemplo.

No genoma dos seres eucariotas existem sequências curtas de nucleótidos (2 a 6) repetidas em cadeia e distribuídas relativamente ao acaso, designadas por microssatélites (Diogo, 2011). A técnica de ISSR baseia-se na amplificação termocíclica de fragmentos de DNA flanqueados por dois microssatélites invertidos (Sá, 2010). Para isto, a ISSR utiliza uma sequência simples repetida como iniciador oligonucleotídeo que é complementar a estes dois microssatélites (Silva *et al*, 2011).

Com este estudo, pretende-se caraterizar, do ponto de vista morfológico e genético a população natural de medronheiro do concelho de Castelo de Paiva, tendo em vista a sua preservação e produção.

METODOLOGIA E ANÁLISE DE DADOS

No sentido de se proceder à caracterização morfológica e genética da população de *A. unedo* de Castelo de Paiva foram selecionados e recolhidos 10 genótipos, distribuídos por diferentes freguesias do concelho. Na figura 1, apresenta-se a localização geográfica de cada um dos genótipos.

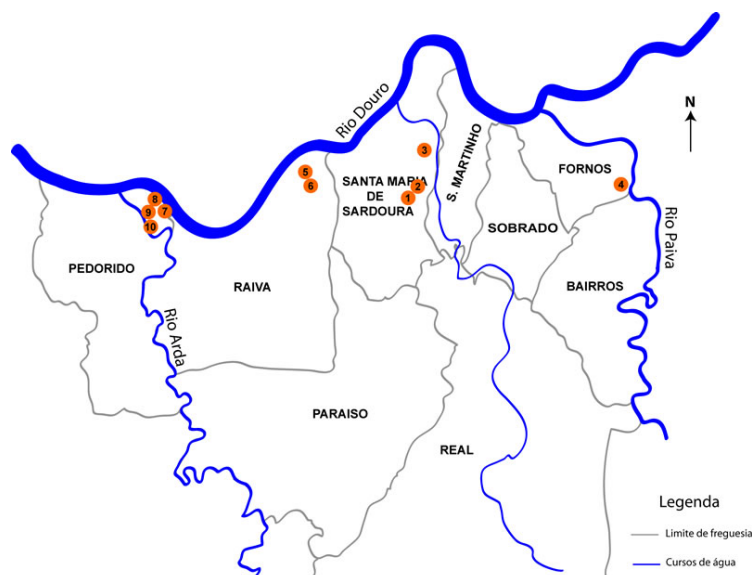


Figura 1. Mapa do concelho de Castelo de Paiva identificando a localização dos medronheiros estudados. Genótipos 1 (S.Gens), 2 (Felgueire) e 3 (Pereire) – freguesia de Santa Maria de Sardoura. Genótipo 4 (Casal das Varzielas) – freguesia de Fornos. Genótipos 5 (EB1) e 6 (Cuzamento Picoto) – freguesia de Mídões. Genótipos 7 (N222 – Km 34,4) 8 ((N222 – Km 34), 9 (Monte do Areinho – vertente para o Arda) e 10 (Monte do Areinho – vertente para o Douro) – freguesia de Pedorido.

Caraterização morfológica

Na caraterização morfológica dos genótipos foram tidos em conta os seguintes caracteres: comprimento e largura da folha, área foliar, comprimento do pedúnculo, peso fresco e seco, forma da margem, do ápice e da base da folha e do limbo, para um total de 40 folhas por genótipo.

Caraterização genética

A caraterização genética envolveu as seguintes etapas: extração de DNA, utilizando o método de extração CTAB otimizado (Sá, Pereira & Batista, 2011); amplificação termocíclica do DNA recorrendo a marcadores moleculares ISSR e separação eletroforética de ácidos nucleicos em gel de agarose 2% (p/v). Na tabela 1 apresentam-se os 5 iniciadores oligonucleotídeos utilizados na amplificação ISSR.

Tabela 1. Iniciadores oligonucleotídeos utilizados na amplificação e respetiva sequência nucleotídica

Designação	Sequência 5'→3'
817	CACACACACACACAA
834	AGAGAGAGAGAGAGAYT
840	GAGAGAGAGAGAGAYT
858	TGTGTGTGTGTGTGRT
AW	A CACACACACACAGT
Y = C ou G; R = A ou T.	

Resultados e discussão

Caraterização morfológica

Da análise dos dados recolhidos para os caracteres morfológicos em estudo, verificou-se que para os 10 genótipos, a forma da margem é serrada, a forma da base da folha é acunhada, a forma do ápice da folha é aguda e a forma do limbo é lanceolada. Relativamente aos caracteres mensuráveis, a tabela 2 apresenta os valores médios, medidos em folhas dos 10 genótipos, os seus desvios padrão e os valores máximos e mínimos.

Tabela 2. Valores (Média ± desvio padrão) de cinco caracteres morfológicos determinados em 40 folhas por genótipo. Em parêntesis é indicado o valor máximo e mínimo registado para cada carater.

Genótipo	Comprimento da folha (cm)	Largura da folha (cm)	Área foliar (cm ²)	Comprimento do pedúnculo (cm)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
1	6,61 ± 0,60 (5,50 - 7,90)	2,42 ± 0,29 (1,60 - 3,00)	16,04 ± 2,89 (9,60 - 22,12)	0,71 ± 0,15 (0,50 - 1,00)	0,36 ± 0,08 (0,21 - 0,55)	0,18 ± 0,04 (0,11 - 0,29)
2	7,36 ± 0,61 (6,00 - 8,30)	3,22 ± 0,37 (2,40 - 3,90)	23,80 ± 4,11 (14,40 - 30,71)	0,65 ± 0,09 (0,50 - 0,90)	0,66 ± 0,14 (0,36 - 0,90)	0,32 ± 0,07 (0,18 - 0,46)
3	5,35 ± 0,73 (4,20 - 7,70)	2,69 ± 0,41 (1,70 - 3,60)	14,51 ± 3,84 (8,50 - 27,36)	0,68 ± 0,15 (0,40 - 1,00)	0,33 ± 0,10 (0,20 - 0,70)	0,17 ± 0,06 (0,08 - 0,39)

4	8,21 ± 1,29 (5,60 - 10,40)	2,66 ± 0,55 (1,30 - 3,50)	22,22 ± 7,01 (10,03 - 33,66)	0,89 ± 0,18 (0,60 - 1,20)	0,39 ± 0,12 (0,15 - 0,58)	0,16 ± 0,05 (0,05 - 0,24)
5	6,80 ± 1,05 (4,50 - 8,80)	3,26 ± 0,61 (0,70 - 4,00)	22,48 ± 6,64 (4,90 - 34,32)	0,66 ± 0,13 (0,40 - 0,90)	0,34 ± 0,09 (0,17 - 0,49)	0,20 ± 0,05 (0,08 - 0,33)
6	7,28 ± 0,78 (5,30 - 8,70)	2,69 ± 0,38 (1,30 - 3,30)	19,77 ± 4,27 (7,80 - 27,00)	0,88 ± 0,16 (0,40 - 1,20)	0,43 ± 0,09 (0,23 - 0,59)	0,16 ± 0,04 (0,09 - 0,24)
7	7,15 ± 0,85 (5,60 - 9,00)	3,14 ± 0,43 (2,40 - 4,30)	22,65 ± 5,41 (14,00 - 36,98)	0,48 ± 0,13 (0,20 - 0,70)	0,56 ± 0,14 (0,34 - 1,02)	0,20 ± 0,05 (0,04 - 0,28)
8	7,14 ± 0,90 (4,90 - 8,60)	3,56 ± 0,50 (2,60 - 4,90)	25,63 ± 6,12 (12,74 - 40,42)	1,02 ± 0,16 (0,50 - 1,30)	0,52 ± 0,11 (0,31 - 0,75)	0,52 ± 0,11 (0,31 - 0,75)
9	6,75 ± 0,52 (5,40 - 7,90)	2,59 ± 0,24 (2,00 - 3,00)	17,53 ± 2,74 (12,40 - 22,50)	0,49 ± 0,05 (0,40 - 0,60)	0,43 ± 0,06 (0,32 - 0,56)	0,24 ± 0,05 (0,15 - 0,35)
10	6,88 ± 0,79 (4,80 - 8,30)	2,53 ± 0,39 (1,90 - 3,20)	17,58 ± 4,13 (9,12 - 25,73)	0,60 ± 0,11 (0,40 - 0,90)	0,40 ± 0,10 (0,20 - 0,57)	0,22 ± 0,04 (0,15 - 0,29)
Média ± Desv. Padrão	6,95 ± 1,08	2,87 ± 0,56	20,2 ± 5,99	0,7 ± 0,21	0,44 ± 0,15	0,21 ± 0,07
Coefficiente variação (%)	15,49%	19,49%	29,64%	30,26%	32,99%	33,21%

Os resultados da tabela 2 revelam que, para todos os caracteres analisados, existe variação morfológica entre os genótipos estudados.

Nos caracteres, comprimento da folha, largura da folha e área foliar os valores de coeficiente de variação situam-se entre os 15 e os 30%. Estes valores indicam que a variação nestes caracteres é média. Nos caracteres comprimento do pedúnculo, peso seco e peso fresco os valores de coeficiente de variação situam-se acima dos 30%. Estes valores indicam que a variação nestes caracteres é elevada. Tais resultados estão em concordância com os que foram obtidos no estudo morfológico e genético de 4 populações naturais de *A. Unedo* dos distritos de Bragança, Castelo Branco, Vila Real e Viseu (Sá, 2010).

Para o comprimento da folha, os valores variam entre 4,20 cm no genótipo 3 e 10,40 cm no genótipo 4. O valor médio é 6,95 cm. A largura da folha varia entre 0,70 cm no genótipo 5 e 4,90 cm no genótipo 8.

O comprimento do pedúnculo varia entre 0,20 cm no genótipo 7 e 1,30 cm no genótipo 8. O valor médio para o comprimento do pedúnculo é de 0,70 cm. O peso seco varia entre 0,04 g no genótipo 7 e 0,75 g no genótipo 8. O valor médio do peso seco é de 0,21 g. O peso fresco varia entre 0,15 g no genótipo 4 e 1,02 g no genótipo 7. O valor médio do peso fresco é de 0,44g.

A tabela 3 apresenta os resultados obtidos na análise de variância ANOVA: Fator único, aplicada a combinações de dois genótipos diferentes. Esta análise foi realizada para os 5 caracteres morfológicos mensuráveis.

Tabela 3. Resultados da análise de variância Anova: Fator único realizada a pares de genótipos, para 5 caracteres morfológicos das folhas. NS: Não significativo corresponde a um valor $P > 0,05$ (genótipo aparentado). Valores $P \leq 0,05$ indicam que os genótipos são distintos.

Genótipos	Comp. Folha	Larg. Folha	Área Foliar	Comp. Pedúnculo	Peso Fresco	Peso seco
1 e 2	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,05	P<0,001	P<0,001
1 e 3	P<0,001	P<0,001	P<0,05	NS	NS	NS
1 e 4	P<0,001	P<0,05	P<0,001	P<0,001	NS	P<0,05
1 e 5	NS	P<0,001	P<0,001	NS	NS	NS
1 e 6	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	NS
1 e 7	P<0,01	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,05
1 e 8	P<0,01	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
1 e 9	NS	P<0,01	P<0,05	P<0,001	P<0,001	P<0,001
1 e 10	NS	NS	P<0,001	P<0,001	NS	P<0,001
2 e 3	P<0,001	P<0,001	P<0,001	NS	P<0,001	P<0,001
2 e 4	P<0,001	P<0,001	NS	P<0,001	P<0,001	P<0,001
2 e 5	P<0,01	NS	NS	NS	P<0,001	P<0,001
2 e 6	NS	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
2 e 7	NS	NS	NS	P<0,001	P<0,01	P<0,001
2 e 8	NS	P<0,001	NS	P<0,001	P<0,001	P<0,001
2 e 9	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
2 e 10	P<0,01	P<0,001	P<0,001	P<0,05	P<0,001	P<0,001
3 e 4	P<0,001	NS	P<0,001	P<0,001	P<0,05	NS
3 e 5	P<0,001	P<0,001	P<0,001	NS	NS	NS
3 e 6	P<0,001	NS	P<0,001	P<0,001	P<0,001	NS
3 e 7	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,05
3 e 8	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
3 e 9	P<0,001	NS	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
3 e 10	P<0,001	NS	P<0,001	P<0,01	P<0,01	P<0,001
4 e 5	P<0,001	P<0,001	NS	P<0,001	NS	P<0,001
4 e 6	P<0,001	NS	NS	NS	NS	NS
4 e 7	P<0,001	P<0,001	NS	P<0,001	P<0,001	P<0,001
4 e 8	P<0,001	P<0,001	P<0,05	P<0,001	P<0,001	P<0,001
4 e 9	P<0,001	NS	P<0,001	P<0,001	P<0,05	P<0,001
4 e 10	P<0,001	NS	P<0,001	P<0,001	NS	P<0,001
5 e 6	P<0,05	P<0,001	P<0,05	P<0,001	P<0,001	P<0,01
5 e 7	NS	NS	NS	P<0,001	P<0,001	NS
5 e 8	NS	P<0,05	P<0,05	P<0,001	P<0,001	P<0,001
5 e 9	NS	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
5 e 10	NS	P<0,001	P<0,001	P<0,05	P<0,05	P<0,05
6 e 7	NS	P<0,001	P<0,05	P<0,001	P<0,001	P<0,01
6 e 8	NS	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
6 e 9	P<0,001	NS	P<0,01	P<0,001	NS	P<0,001
6 e 10	P<0,05	NS	P<0,05	P<0,001	NS	P<0,001
7 e 8	NS	P<0,001	P<0,05	P<0,001	NS	P<0,001
7 e 9	P<0,05	P<0,001	P<0,001	NS	P<0,001	P<0,001
7 e 10	NS	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	NS
8 e 9	P<0,05	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	NS
8 e 10	NS	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,01
9 e 10	NS	NS	NS	P<0,001	NS	P<0,01

Os resultados da tabela 3 revelam a existência de um maior número de pares de genótipos com diferenças relevantes ($P < 0,05$) ao nível dos seguintes caracteres: comprimento

do pedúnculo, peso fresco, peso seco e área foliar. Mais uma vez salientam-se estes caracteres morfológicos como os mais discriminantes.

Não existe uma relação clara entre a distância ou proximidade geográfica e o grau de semelhança morfológica entre genótipos, isto é, genótipos geograficamente próximos não são obrigatoriamente aparentados. Por exemplo, os genótipos 5 e 6 são geograficamente próximos, contudo, apresentam diferenças morfológicas significativas. Esta situação repete-se quando se comparam todos os genótipos, à exceção dos genótipos 9 e 10 que são geograficamente próximos e as diferenças morfológicas são pouco significativas.

Caraterização genética

Os produtos da amplificação ISSR originaram, para todos os iniciadores oligonucleotídeos, padrões de bandas distintos. Os cinco iniciadores ISSR selecionados permitiram a obtenção de 132 fragmentos. O número de fragmentos por iniciador variou entre 3 e 10, tendo sido obtido em média 5 fragmentos por iniciador.

Entre os iniciadores oligonucleotídeos testados, o 840 e o AW foram os mais polimórficos, já que permitiram distinguir, genotipicamente, mais indivíduos. Pelo contrário, o iniciador oligonucleotídeo 834 foi o menos polimórfico. A figura 2 mostra, a título de exemplo, a diferença entre iniciadores oligonucleotídeos, muito (ex.: 817) e pouco (ex.: 834) polimórficos.

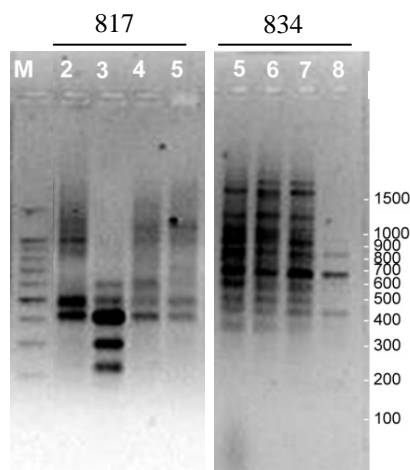


Figura 2. Polimorfismo dos iniciadores oligonucleotídeos 817 e 834. M-marcador de peso molecular 100pb (promega). A eletroforese foi realizada em 2% (p/ v) de gel de agarose.

Comparando os resultados da caracterização morfológica e da caracterização genética, constatou-se que não existe uma correspondência total entre as diferenças e semelhanças, entre os pares de genótipos. Por exemplo, através do oligonucleotídeo 834 verificou-se que os genótipos 5 e 6 são aparentados. Esta diferença não é apoiada pelos resultados da análise de variância (tabela 2), já que nestes genótipos todos os caracteres morfológicos apresentam

diferenças consideráveis. Saliente-se que, a caracterização morfológica restringe-se a um conjunto de caracteres influenciados pelo ambiente. Em contra partida a caracterização genética incide sobre o genoma dos indivíduos.

Diversidade genética da população

O dendrograma da figura 3 apresenta as distâncias genéticas entre os diferentes genótipos e foi obtido pelo método de agrupamento UPGMA (Método de Agrupamento não Ponderado com base na Média Aritmética). O agrupamento, bem como a determinação de todos os parâmetros genéticos foram estimados usando o programa PopGene.

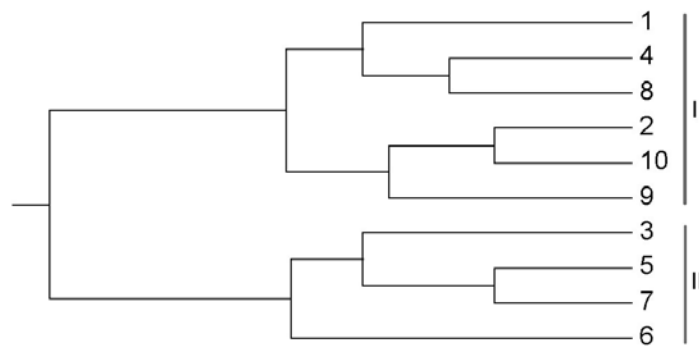


Figura 3. Dendrograma de 10 genótipos de *A. unedo* L. (1-10), obtido a partir do coeficiente de similaridade de Jaccard, pelo método de agrupamento UPGMA.

O dendrograma da figura 3 mostra que os 10 genótipos de *A. unedo* L. estudados podem ser agrupados em dois grandes grupos (I e II) e que não existe uma relação clara entre a distância ou proximidade geográfica e o grau de semelhança entre genótipos.

A diversidade genética média de Nei's foi igual a $0,41 \pm 0,10$. O índice de Shannon foi igual a $0,59 \pm 0,12$. Como este índice varia de 0 a 1, e quanto mais próximo de 0 menor é a diversidade, pode-se considerar que a diversidade da população analisada é média a alta. No entanto, convém salientar que para um melhor conhecimento da diversidade genética, o estudo deveria contemplar um maior número de genótipos.

CONCLUSÃO

Com este trabalho tentou-se, pela primeira vez, caracterizar morfológicamente e geneticamente a população de *A. unedo* do Concelho de Castelo de Paiva. A caracterização morfológica teve em conta 10 caracteres ao nível da folha. Os resultados demonstraram que os genótipos estudados podem ser distinguidos através de caracteres morfológicos foliares.

Dos caracteres morfológicos analisados, os que permitem distinguir melhor os genótipos da população em estudo são: o comprimento do pedúnculo, o peso fresco e o peso seco da folha. A caracterização genética foi realizada através do marcador molecular ISSR. Os primeiros utilizados que se mostraram mais polimórficos, e por isso mais úteis na distinção de genótipos, foram o 840 e AW. Os resultados obtidos, quer na análise morfológica como na molecular, indicam que a variabilidade genética na população estudada é média a alta.

Para trabalhos futuros sugere-se a repetição da técnica de ISSR para os primeiros em que não foi possível visualizar o produto da amplificação. Sugere-se, ainda, a avaliação da diversidade genética desta população, utilizando um maior número de indivíduos, e a determinação do grau de parentesco entre os genótipos em estudo pela utilização de ferramentas bioinformáticas.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradecemos à Sra. Professora Doutora Paula Cristina Santos Baptista da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança (IPB), pela simpatia, atenção e disponibilidade demonstradas ao longo deste trabalho, principalmente, durante as atividades laboratoriais realizadas no IPB. À Fundação Ilídio Pinho pela oportunidade de participar no concurso Ciência na Escola e pelo apoio financeiro. A todos os elementos da comunidade educativa do Agrupamento Vertical de Escolas de Castelo de Paiva pelo apoio prestado. À empresa Joalto pelo apoio financeiro prestado nas deslocações ao IPB.

REFERÊNCIAS

- Costa, J. C. (2010). Utilização de Marcadores ISSR na Caracterização de Cultivares. <http://lira.pro.br/wordpress/wp-content/uploads/downloads/2010/11/revisao-jose-carlos.pdf> (acedido em 22/05/2012).
- Diogo, C. G. R. G. (2011) Identificação de cultivares por microssatélites – aplicação à ervilha proteaginoso. http://repositorio.ipcb.pt/bitstream/10400.11/720/1/Carlos_microsat_ervilha.pdf (acedido em 22/04/2012).
- Pedro, J. (1994). Carta da distribuição de figueira e medronheiro – Notícia Explicativa. Ministério do Ambiente e Recursos Naturais, Direção Geral do Ambiente. Lisboa.
- Sá O., Pereira J.A., Baptista P. (2011). Optimization of DNA Extraction for RAPD and ISSR Analysis of *Arbutus unedo* L. Leaves. *International Journal of Molecular Sciences* 12(6): 4156- 4164.
- Sá, O. (2010). Caracterização Morfológica, Molecular e Química de *Arbutus unedo* L. com vista à selecção de genótipos de superior qualidade. Tese de mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto Politécnico de Bragança.
- Silva, K. V. P., Alves, A. A. C., Martins, M. I. G., Melo, C. A. F., Carvalho, R. (2011). Variabilidade genética entre acessos do género *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR - <http://webnotes.sct.embrapa.br/pdf/pab2011/09/46n09a16.pdf> (acedido em 22/04/2012).