

**CORRELAÇÕES FENOTÍPICAS E GENOTÍPICAS A EXPRESSÃO DE
VINCRISTINA E VIMBLASTINA RELATIVAS AO EFEITO DO SOLO
EM CARACTERÍSTICAS CONCERNENTES A *CATHARANTHUS
ROSEUS***

**PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CORRELATIONS WITH THE
EXPRESSION OF VINCRISTINE AND VINBLASTINE RELATED TO THE
EFFECT OF THE SOIL IN CHARACTERISTICS CONCERNING
*CATHARANTHUS ROSEUS***

^{1*} Felipe Cruz Paula

² Israel Felipe Gonçalves Soares

³ José Dias de Souza Neto

⁴ Monique Moreira Moulin

⁵ Ana Paula Candido Gabriel Berilli

⁶ Larissa Carvalho Nascimento

⁷ Irany Rodrigues Pretti

¹ Instituto Federal do Espírito Santo - Campus de Alegre (IFES). E-mail: phylpypaula@gmail.com

² Instituto Federal do Espírito Santo - Campus de Alegre (IFES). E-mail: filipeisraelgoncalves@gmail.com

³ Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Campus Vale (UFRGS). E-mail: jdiansneto@gmail.com

⁴ Instituto Federal do Espírito Santo - Campus de Alegre (IFES). E-mail: moniquemoulin@gmail.com

⁵ Instituto Federal do Espírito Santo - Campus de Alegre (IFES). E-mail: anapaulacg@gmail.com

⁶ Instituto Federal do Espírito Santo - Campus de Alegre (IFES). E-mail: larissacn.nutri@gmail.com

⁷ Instituto Federal do Espírito Santo - Campus Itapina (IFES). E-mail: iranyrpretti@gmail.com

* Autor correspondente

Artigo submetido em 14/03/2021, aceito em 25/06/2021 e publicado em 06/08/2021.

Resumo: O Brasil possui cerca de oito mil produtores de flores e plantas. Juntos, eles cultivam mais de 350 espécies com cerca de três mil variedades. *Catharanthus roseus* ou popularmente conhecida como vinca é uma planta herbácea perene, nativa da ilha de Madagascar que apresenta grande versatilidade de uso para floricultura quanto para indústria farmacêutica, assim o interesse pela vinca se justifica pelo fato de que sua produção e acúmulo de alcalóides nas folhas (vimblastina e vincristina) são responsáveis pela atividade antileucêmica nos tratamentos quimioterápicos e o uso de seus metabólitos têm sido utilizados, principalmente para a fabricação de medicamentos contra o câncer. Assim, o presente artigo buscou destacar quais fatores são responsáveis pelo aumento do conteúdo de vincristina e vimblastina em *C. roseus*. Dessa forma, quatro variedades comerciais foram cultivadas em vasos de 5 litros, e analisadas os seus perfis morfológicos, moleculares realizados em RT-qPCR e estatísticas pelo programa GENES. Assim, os resultados permitiram identificar que a variedade Sunstorm Blush apresentou maior expressão em relação ao Latossolo B, porém, não foram detectadas diferenças estatística para os demais tratamentos e quanto maior o tamanho do diâmetro da flor maior será a expressão dos genes DAT e D4H.

Palavras-chave: Vinca, alcalóides, diversidade, RT-qPCR e expressão gênica.

Abstract: Brazil has about eight thousand producers of flowers and plants. Together, they grow more than 350 species with about three thousand varieties. *Catharanthus roseus* or popularly known as vinca is a herbaceous perennial plant, native to the island of Madagascar that presents great versatility of use for floriculture as for the pharmaceutical industry, thus the interest in vinca is justified by the fact that its production and accumulation of alkaloids in the leaves (vimbastine and vincristine) are responsible for the antileukemic activity in chemotherapeutic treatments and the use of its metabolites have been used mainly for the manufacture of drugs against cancer. Thus, the present paper sought to highlight which factors are responsible for the increased content of vincristine and vimbastine in *C. roseus*. Thus, four commercial varieties were grown in 5-liter pots, and their morphological, molecular profiles were analyzed by RT-qPCR and statistics by the GENES program. Thus, the results allowed us to identify that the variety Sunstorm Blush showed greater expression in relation to Latosol B, however, no statistical differences were detected for the other treatments and the larger the size of the flower diameter the greater the expression of the genes DAT and D4H.

Keywords: Vinca, alkaloids, diversity, RT-qPCR and gene expression.

1 INTRODUÇÃO

O setor de floricultura cresceu nos últimos 20 anos, com uma média anual de 6 a 9%. Os dez maiores produtores são: Holanda (52%), Colômbia (15%), Equador (9%), Quênia (7%), Bélgica (3%), Etiópia (2%), Malásia, Itália, Alemanha e Israel (1%) (PREETI et al., 2019).

Embora o Brasil tenha cerca de oito mil produtores de flores e plantas, cultivando mais de 350 espécies, com três mil variedades e uma área cultivada de 15.600 ha, a floricultura no Brasil é um mercado em expansão que contribui para a geração de empregos no campo. No Brasil, os estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo são os principais produtores e exportadores (IBRAFLOR, 2019).

Contudo, nos últimos anos o segmento de Plantas Ornamentais tem crescido bastante, mesmo não havendo marketing que promova o setor de uma forma geral e modernização em grande parte das áreas de cultivo (RIBEIRO, 2012). Assim, existe um grande potencial de melhoria nos aspectos de produção e diversificação dessas produções, principalmente pelo atual aumento da demanda e uso de medicamentos pelas plantas, visto como uma promessa para novos agentes quimioterápicos com efeitos mais potentes, seletivos e menos negativos (BENNOUNA et al., 2008; MISHA; VERNA, 2017).

Das flores de cultivo, a vinca *Catharanthus roseus*, uma planta perene nativa da ilha de Madagascar, que apresenta grande versatilidade de uso para floricultura, tendo um grande potencial para indústria farmacêutica e ornamental (MISHRA; VERMA, 2017).

Destaca-se devido a pesquisas relacionadas ao fato de sua produção e acúmulo dos alcalóides vimbastina e vincristina, que apresentam atividade antileucêmica nos tratamentos quimioterápicos. (BARRALES-CUREÑO, 2005). Assim, esses metabólitos têm sido utilizados, principalmente, para a fabricação de medicamentos em tratamentos de combate ao câncer (HUGO et al., 2010).

Visando identificar as cultivares de *C. roseus* com alta expressão para precursores desses metabólitos, este trabalho buscou compreender e quantificar alguns dos fatores bióticos e abióticos associados à expressão vincristina e vimbastina em quatro variedades de vinca por meio da expressão dos genes *DAT* e *D4H*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Sementes de quatro cultivares de *C. roseus* (Figura 1) foram embebidas em solução de GA3 (1g.L⁻¹), por 24 horas e semeadas em substrato comercial, sendo transplantadas após atingirem 7 cm para

vasos de um litro com latossolo acrescido de areia e adubo orgânico, na proporção de 2:1. Três plantas de cada variedade foram separadas para análises morfológicas e uma para clonagem.

Figura 1: Cultivares de *C. roseus* utilizados em experimentos com respectiva codificação. 4- Sunstorm White With Eye; 7 -Sunstorm Blush; 10- Sunstorm Scarlet With Eye; 19- Cora Deep Lavender.



Fonte: autores, 2021.

Clonagem

Foram retirados estacas de mínimo de 10 x 0,5 cm (comprimento x diâmetro) com duas folhas cortadas ao meio, de cada variedade. O enraizamento foi induzido nas estacas, mantidas por 12 h em solução de AIA e ANA 1mM. Após, estas foram transplantadas para vasos de cinco litros com seguintes substratos: areia ou areia: latossolo (1:1) com três estacas por repetição de cada variedade, sendo três repetições por substrato. A adubação e irrigação seguiram conforme descrito por Melo e Alvarenga (2009).

Após atingirem porte adulto, foram retiradas algumas folhas para extração do RNA usado nas análises de expressão gênica de *DAT* e *D4H*. Foram feitas três repetições biológicas em cada uma dessas variáveis.

RT-qPCR

O RNA das plantas clonadas foi extraído por TriZol®, de acordo com especificações do fabricante. A síntese de cDNA, foi realizada com 1 µg de RNA das amostras com uso de Reverse Transcription Kit (SCRIPT cDNA Synthesis Kit -Jena Bioscience). A qPCR foi feita em termociclador Step One Plus com uso de primers para os genes *DAT* e *D4H*,

normalizados com 18SrRNA, conforme Mokhaberi et al. (2014). O volume final da reação para qPCR foi de 15 µL: 2 µl de cDNA, 10 µL SYBR Green qPCR Master Mix, 0,2 µL dos oligos e água ultrapura para ajuste de volume.

As condições de amplificação seguiram conforme Mokhaberi et al. (2014). Os dados de expressão gênica foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (LIVAK et al., 2001).

Análises morfológicas

Após atingirem primeiro florescimento, as plantas foram analisadas segundo Mishra et al. (2001) quantos aos caracteres: altura da planta (AP) (cm), número de folhas (NF), diâmetro da flor (DF) (cm) e diâmetro do tubo da corola (DC). Para comprimento da folha (CF) (cm), largura da folha (LF) (cm) e área foliar (AF) (cm²) foram usados morfometria por imagem pelo software ImageJ (SCHNEIDER, RASBAND e ELICEIRI, 2012).

Análise dos dados

Os dados de origem qualitativa foram avaliados pelo método de variáveis multicategóricas, com coeficiente de distância binária de Sokal (CRUZ, 2013).

Os dados quantitativos foram submetidos a teste de normalidade Lilliefors (LILLIEFORS, 1967) para posterior análise de Variância, a 1 e 5% de probabilidade pelo teste F, para constatar a existência de variabilidade entre os acessos.

Para obtenção das médias e da matriz de variância e covariância residual utilizou-se o teste de médias Scott Knott a 5%. A partir da matriz de variância e covariância residual obteve-se a matriz de dissimilaridade entre os cultivares pela distância generalizada de Mahalanobis (D2) e posterior quantificação da contribuição relativa dos caracteres para a diversidade (SINGH, 1981).

O agrupamento dos acessos quanto sua diversidade foi feita pela ligação média entre grupos (UPGMA) e o ponto de corte definido pelo número de clusters formados pela PCA.

Para as análises de correlações (Path Analysis) foram definidos os fatores principais, valores de expressão de *DAT* e *D4H* para ambos substratos de cultivo, e secundários, demais caracteres morfológicos quantitativos.

A Análise de correlações foi realizada com uso do pacote Lavaan e Corrplot no software R (ROSSEEL, 2012). Demais análises foram realizadas com uso do software GENES (CRUZ, 2016).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises das características morfológicas em relação às expressões moleculares apresentadas na tabela 1, demonstram que em relação ao teste F, as seguintes características AP, LF e as

expressões DAT-A, D4H-A, DAT-B e D4H-B não apresentaram significância ao teste F. Já as características NF e DC, foram significativas a 5% enquanto CF, AF e DF apresentaram 1% de significância.

Analisando o coeficiente de variação dentre os caracteres morfológicos podemos observar que existe uma discrepância significativa entre a AP e DF e demais caracteres morfológicos quanto aos valores de herdabilidade.

As características de área foliar, comprimento da folha e diâmetro da flor foram os que mais apresentaram índices de herdabilidade genética, respectivamente 95.85%, 94.67% e 93.95%, em contrapartida o caractere altura da planta foi o com menor valor 34.07%, possuindo maior parcela deste fenótipo associado ao componente ambiental. Segundo REIS, et al. 2017, as características associadas ao comprimento da folha, também contribuíram para a herdabilidade genética em seu estudo.

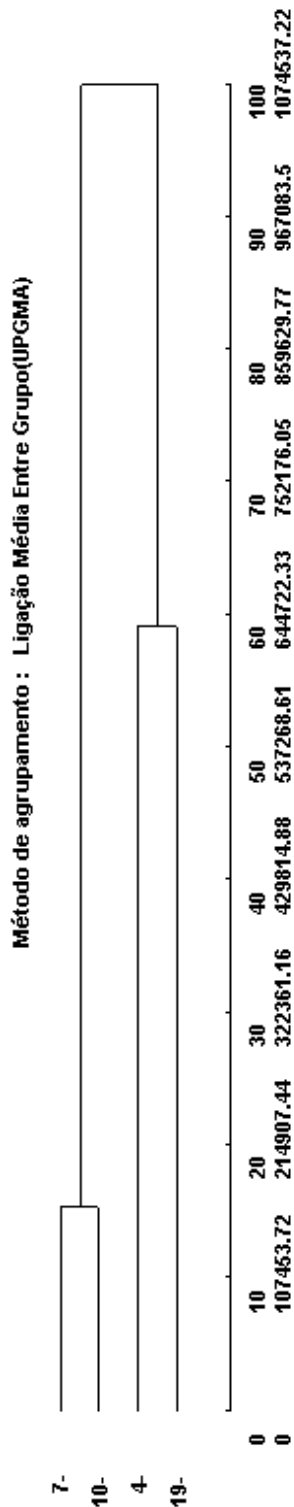
Tabela 1: ANOVA das 7 características quantitativas e 4 moleculares de 4 variedades *C. roseus* Ifes, Alegre, ES.

| ANOVA das características morfológicas e moleculares | | | | |
|--|------------|-------|--------|-----------|
| Variáveis | F | Média | CV (%) | H (%) |
| Altura da planta (cm) | 37.9097 ns | 25.04 | 19.96 | 34.07 |
| Número de folhas (um) | 116.9722 * | 21.25 | 19.10 | 85.92 |
| Comprimento da folha (cm) | 3.9478 ** | 06.28 | 07.30 | 94.67 |
| Largura da folha (cm) | 0.4142 ns | 03.08 | 13.89 | 55.94 |
| Área foliar (cm ²) | 59.5556 ** | 18.00 | 08.74 | 95.85 |
| Diâmetro da flor (cm) | 60.6164 ** | 36.01 | 05.32 | 93.95 |
| Diâmetro do tubo da corola (cm) | 0.3489 * | 03.37 | 05.67 | 89.57 |
| DAT-A | 0.1178 ns | 01.29 | 70.85 | -614.62 |
| D4H-A | 0.0002 ns | 01.01 | 15.93 | -12705.50 |
| DAT-B | 0.872 ns | 01.50 | 75.87 | -63.98 |
| D4H-B | 1.3418 ns | 01.38 | 88.84 | -08.32 |

** e * significativos a 1 e 5% de probabilidade; respectivamente; pelo teste F. ns não-significativo; pelo teste F; CV: Coeficiente de variação; H: Herdabilidade.

Figura 2: Dendrograma de dissimilaridade

genética entre 4 variedades de *C. roseus*, obtido pelo método de agrupamento entre Ligação Média Entre Grupo -UPGMA, utilizando a distância de Mahalanobis como medida de dissimilaridade genética. Ifes, Alegre, ES.



Fonte: autores, 2021.

Com a utilização dos dados morfológicos de natureza quantitativa e qualitativa, foi realizada uma análise da dissimilaridade entre os acessos. Por não haver discrepâncias entre as topologias dos dendrogramas, estes foram concatenadas e apresentados na Figura 2.

Constata-se que estes possuem uma ampla variabilidade genética associada às características morfológicas estudadas. Em contrapartida, quando analisamos os resultados da ANOVA para os valores de expressão dos genes DAT e D4H em todos os tratamentos, não se torna significativo esta diferença mostrada pelos dados morfológicos. Assim, pode-se supor que a estrutura ou expressão destes genes aparentam possivelmente sofrer seleção negativa, já que a constituição/expressão dos genes estão sendo conservados, evitando surgimento de alterações nas suas sequências gênicas, o que poderia acarretar alterações na expressão deste. Isto poderá ser verificado por meio de análises e testes de seleção das sequências destes genes.

Segundo Jangarelli, et al. (2011) destacou em seu estudo, os níveis de alta significância possibilitaram detectar o efeito coletivo dos genes relacionados ao caráter, propiciando redução nas respostas fenotípicas ao longo das gerações.

Joaquim e El-hani (2010), dizem que essa relação destaca-se pelo fato de que a complexidade da expressão gênica está especialmente associada ao grande número de processos vinculados à sua regulação.

Pela análise de contribuição de caracteres (SINGH, 1981), (Tabela 2) e averiguação da matriz de dissimilaridade, percebe-se que NF e DF foram as com maior contribuição para separação dos acessos.

Segundo Ferreira (2003), a variável (DF) contribui para a separação dos indivíduos, isso também se confirma em nossos estudos, compreendendo que as folhas são as principais estruturas responsáveis pelo crescimento vegetal e captação de energia, e assim como as flores, são de suma relevância para o

desenvolvimento da planta.

Em contrapartida, a variável com a maior contribuição dos caracteres foi (NF) apresentado com cerca de 44,3% do total da diversidade dos acessos estudados.

Compreendendo que relações de diversidade foram observadas quando se correlacionou número de folhas, demonstrado também segundo Falconer (1987) e Souza et al. (2008).

Tabela 2: Contribuição relativa de 11 caracteres aplicados a estudos de diversidade genética de *C. roseus*, IFES, Alegre, ES 2020.

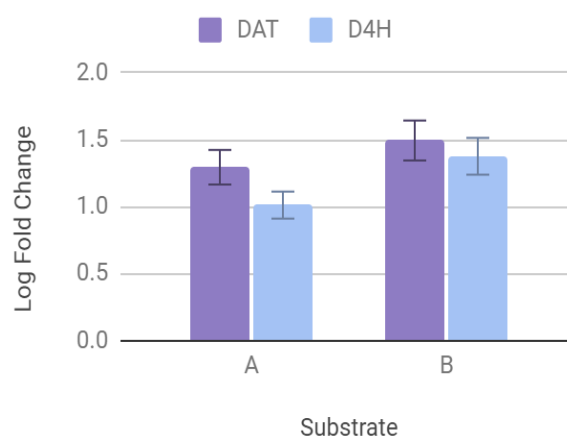
| Variável | Contribuição Relativa (%) |
|---------------------------------|---------------------------|
| Altura da planta (cm) | 00,00 |
| Número de folhas (um) | 38,90 |
| Comprimento da folha (cm) | 00,00 |
| Largura da folha (cm) | 00,00 |
| Área foliar (cm ²) | 7,10 |
| Diâmetro da flor (cm) | 39,40 |
| Diâmetro do tubo da corola (cm) | 00,00 |
| DAT-A | 11,52 |
| D4H-A | 00,44 |
| DAT-B | 2,64 |
| D4H-B | 00,00 |

Fonte: autores, 2021.

Um dos melhores métodos utilizados para a quantificação precisa de expressão gênica é a PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), devido à sua alta sensibilidade (GUO; KI, 2011; BUSTIN, 2000).

Dessa forma, após as análises moleculares das extrações de RNA e a PCR quantitativa, podemos observar que algumas variedades apresentaram variações na expressão dos genes *DAT* e *D4H* de acordo com o substrato utilizado conforme o Figura 3.

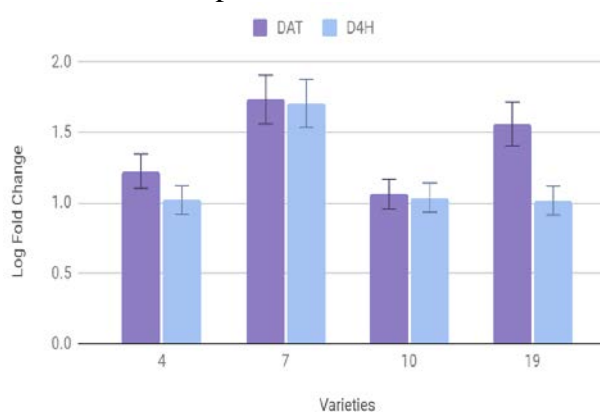
Figura 3: Valores de expressão dos genes *DAT* e *D4H* quanto ao tipo de substrato de cultivo das variedades de *C. roseus*.



Fonte: autores, 2021.

Observa-se na figura 3 que, em relação aos substratos utilizados A e B, a expressão gênica de *DAT* e *D4H* são pouco diferenciada, com substrato B apresentando maiores valores para ambos os genes analisados.

Figura 4: Expressão dos genes *DAT* e *D4H* em relação aos cultivares e substratos avaliados nos experimentos.



Fonte: autores, 2021.

Ao analisar os perfis de amplificação dos genes *DAT* e *D4H* no gráfico 4, observa-se semelhanças entre ambos, embora a cultivar 7 foi a que apresentou maior expressão genética em ambos os substratos, verificou-se que não houve grande diferença de expressão. Seria relevante analisar as estruturas das sequências genéticas dos genes estudados

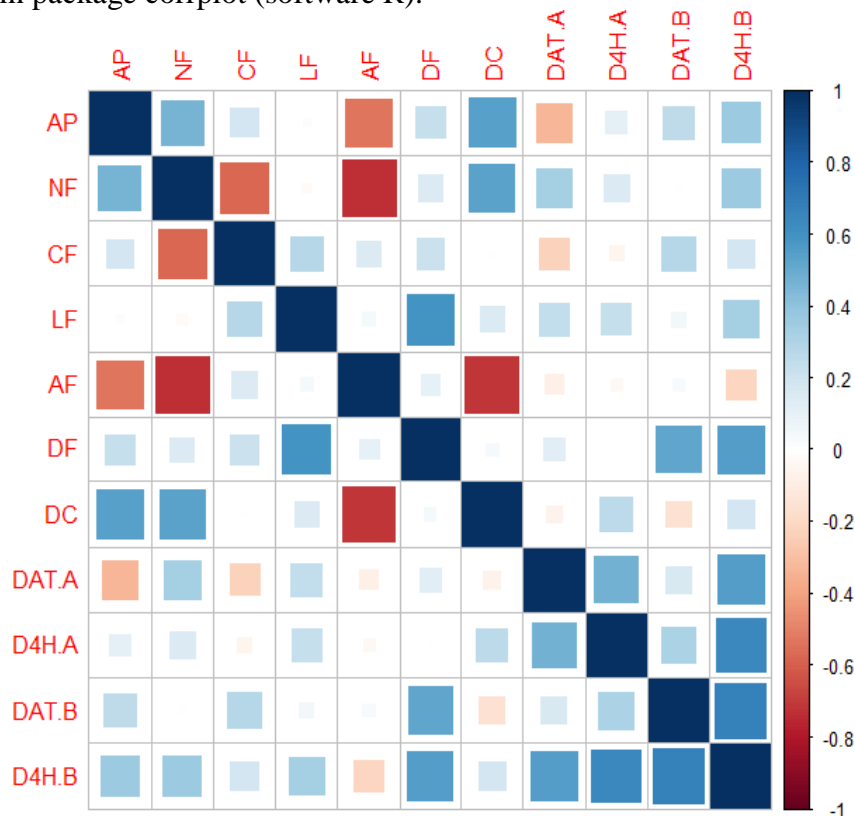
Para encontrar quais características estão associadas aos teores de vincristina e vinblastina foi realizado uma análise de correlação no (software R) identificando as variáveis que influenciam no aumento das expressões gênicas.

Ao analisar a Figura 5, observa-se que a medida que aumenta o tamanho do diâmetro da flor torna-se maior a expressão de *DAT B* e *D4H B*, dessa forma as plantas

que possuem maior DF automaticamente obterão maior expressão por esses genes.

Ao observar outros parâmetros, consta-se que a medida em que a planta dispuser uma AP ou NF maior, inconscientemente obterá um menor valor de AF ou seja as plantas maiores possuem folhas menores. Em contrapartida, quanto maior AP maior será o seu DC e quanto maior valor de NF o DF aumentará (Figura 5).

Figura 5: Valores de correlação entre variáveis morfológicas e moleculares para quatro acessos de *C. roseus* in package corrplot (software R).



Fonte: autores, 2021.

4 CONCLUSÕES

As características número de folhas, diâmetro da flor e diâmetro do tubo da corola foram as mais importantes na estruturação dos acessos quanto à variabilidade morfológica, podendo ser utilizadas apenas estas em estudos de caracterização morfológica das espécies.

Embora a diferença na expressão gênica para *DAT* e *D4H* não seja significativa, a cultivar 7 foi a que

apresentou maior expressão destes nos dois substratos utilizados para o cultivo, sendo maior em substrato B.

O diâmetro da flor foi o que apresentou maior correlação positiva para níveis de expressão dos genes *DAT* e *D4H* em variedades cultivadas no substrato B, o que abre o potencial de cultivo específico para favorecer a expressão desses genes nessas variedades. Análises futuras sobre os aspectos evolutivos desses genes devem ser realizadas para o entendimento e usos

futuros em programas de melhoramento desta espécie para a indústria farmacêutica.

AGRADECIMENTOS

Ao Ifes e à Fapes pela concessão das bolsas de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

BARRALES-CUREÑO, HJ. Aplicaciones farmacológicas y producción biotecnológica in vitro de los alcaloides anticancerígenos de *Catharanthus roseus*. **Biotechnol Appl.** v. 32, n. 1, p. 1101–1110, 2005.

BENNOUNA J., et al. A new microtubule inhibitor agent. **clin. cancer res.** v. 14, n. 6 p. 1625-1632, 2008. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-2219

BUSTIN S. A., Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Jou. of Mol. End.** v. 25, 169–193, 2000.

CRUZ, C. D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Scientiarum.* v. 38, n. 4, p. 547-552, 2016.

CRUZ, C. D., Genes - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **acta scientiarum.** v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

FALCONER, D. S., Introdução à genética quantitativa, **trad. Univ. Fed. de Viç. Imp. Uni.** 1987, p. 279.

FERREIRA, M. M., Avaliação das características de crescimento e desenvolvimento da vinca, *Disert.mestr. em agron. - cur. de pós-grad. em fito., Univ. Fed. de Lav., Brazil.* p 30, 2003.

GUO R.; KI J. S., Evaluation and validation of internal control genes for studying gene expression in the dinoflagellate *prorocentrum minimum*

using real-time pcr. *Jou. of Pro.* v. 48, n.3 p. 199-206. 2011. DOI: 10.1016/j.ejop.2011.11.001

HUGO N. et al., Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **química nova, SP,** v. 33, p. 1359-1369, 2010.

IBRAFLOR. Instituto Brasileiro de Floricultura , 2019. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>

JANGARELLI et al., Níveis de significância na identificação de marcadores moleculares no mapeamento genômico. **Revista Brasileira de Zootecnia** v. 40, n. 2, p. 308-313, 2011.

JOAQUIM L. M; EL-HANI C. N, A genética em transformação: crise e revisão do conceito de gene, **scientiæ zudia,** são paulo, v. 8, n. 1, p. 93-128, 2010.

LILLIEFORS, H. W. On the kolmogorov–smirnov test for normality with mean and variance unknown. **journal of the american statistical association,** v. 62, n.1 p. 399-402. 1967.

LIVAK K. J.; SCHMITTGEN T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2²DDCT Method. **Else. Sci. USA** v. 25, n. 4, p. 402–408. 2001. DOI: 10.1006 / meth.2001.1262.

MELO, A. A. M.; ALVARENGA, A. A., shading of ‘pacifica white’ *catharanthus roseus* (L.) g. don plants with colored nets: vegetative development, **Ciênc. agrotec., Lavras,** v. 33, n. 2, p. 514-520, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542009000200024>

MISHRA P. et al. Padrão de diversidade para características relacionadas ao rendimento morfológico e alcalóide entre os acessos de pervinca *Catharanthus roseus* coletados dentro e

ao redor do subcontinente indiano. **Gen. Res. Crop.** v. 48, p. 273–286. 2001.

MISHRA, J. N. & VERNA, N. K., A brief study on catharanthus roseus: a review. **Inter. jour. of rese. in phar. and phar. scie.** n. 2, p. 20-23, 2017.

MOKHABERI, A., AHMADI, J. A., MAFAKHERI, S., The expression profile of d4h and dat genes in catharanthus roseus in response to drought, salinity and salicylic acid. **iranian jour. of gen. and plant bree.** v. 2, n. 2, p. 1-9. 2014.

PREETI, S. et al., floriculture-world wide production, trade, consumption pattern, market opportunities and challenges, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/332961861_Mar_2_23_min_read_FLORICULTURE-WORLD_WIDE_PRODUCTION_TRADE_CONSUMPTION_PATTERN_MARKET_OPPORTUNITIES_AND_CHALLENGES

REIS, E. D et al; Diversidade genética entre populações de guabirobeiras no estado de Goiás, rev. ceres, viçosa, v. 64, n. 6, p. 631-636. 2017.

RIBEIRO, W. S., Avaliação de substratos e poda na produção de pimenteira ornamental.. 92f. Dissert. maestr. em agron. - cur. de pós-grad. em fito., Univ. Fed. de Viç. 2012.

ROSSEEL, Y., Lavaan: an r package for structural equation modeling. **Jou. of sta. Sof.** v. 48, n. 2, p. 1-36. 2012.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W., Nih image to imagej: 25 years of image analysis, **nature methods** v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **indian journal of genetic and plant breeding**, v. 41, p. 237-245. 1981.

SOUZA M. C. M. et al., Variabilidade genética para características agronômicas em progênes de alface tolerantes ao calor. **Hortic. bras.**, v. 26, n. 3, p. 354-358, 2008.