

2015/001
PON
2015
TS-PP-2015/001

LÍGIA CRISTINE GONÇALVES PONTES



Divergência genética entre acessos de bacurizeiro do banco de
germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental por meio de marcadores

ISSR

BELÉM-PARÁ

2015

LÍGIA CRISTINE GONÇALVES PONTES



Divergência genética entre acessos de bacurizeiro do banco de
germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental por meio de marcadores
ISSR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
colegiado do curso de Licenciatura em Ciências
Biológicas, Modalidade Biologia da Universidade
Federal do Pará, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Licenciado em Biologia.

Orientadora: Elisa Ferreira Moura Cunha

Co-orientadora: Mônica Fecury Moura

TS
2015/001
PON

BELÉM-PARÁ

2015

LÍGIA CRISTINE GONÇALVES PONTES

Divergência genética entre acessos de bacurizeiro do banco de
germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental por meio de marcadores
ISSR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao colegiado do curso de Licenciatura em
Ciências Biológicas, Modalidade Biologia da
Universidade Federal do Pará, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Licenciado
em Biologia.

Orientador: Dra. Elisa Ferreira Moura

Pesquisador A – Embrapa Amazônia Oriental

Co-Orientador: Dra. Mônica Fecury Moura

Pós-doutoranda - UNESP

Avaliador: Dra Maria do Socorro Padilha de Oliveira

Pesquisadora A – Embrapa Amazônia Oriental

Avaliador: Prof. Dra. Cláudia Regina Batista de Souza

Prof. Adjunto II – Universidade Federal do Pará

BELÉM-PARÁ

2015

*Ao Sidney Vasconcelos
pelo companheirismo e amizade*

Dedico

*Aos meus pais Carlos e Núbia
Pela educação que me deram
e aos meus irmãos por toda forma de apoio.*

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Obrigada meu Deus, por ter concluído mais uma etapa na minha vida, por todos os conhecimentos adquiridos durante todos esses anos de estudos e pela saúde que me destes para poder construir uma carreira.

Obrigada aos meus pais, Núbia e Carlos Pontes, que me deram o meu bem mais valioso, que é a minha educação. Obrigada por me darem o apoio essencial para poder chegar um dia em uma universidade e concluí-la com êxito. Obrigada por todo o amor a mim concedido.

Obrigada aos meus irmãos, Leonardo, Carlos Júnior, Nívia e Lívio, por toda ajuda que me deram durante todos esses anos, saibam que minha gratidão por vocês é eterna.

Quero agradecer à Dra Elisa Moura pela excelente orientação à mim concedida durante esses 3 anos de estágio e ao apoio ao meu Trabalho de Conclusão de Curso. Agradecer à Dra Mônica Fecury pela co orientação que foi concedida a mim no período em que realizou seu pós doutorado na Embrapa e no meu Trabalho de Conclusão de Curso.

À Universidade Federal do Pará pela excelente estrutura e currículo do curso de Ciências Biológicas que me faz ter segurança em seguir minha carreira.

À Embrapa pela oportunidade e exemplo para minha vida profissional.

Ao PIBIC e CNPQ pela concessão da bolsa de Iniciação Científica que me ajudou à minha escolha da formação profissional.

Quero agradecer à todos do Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Amazônia Oriental. Aos Técnicos pelo apoio nos trabalhos, aos demais Doutores que por diversas vezes que me ajudaram em alguma dúvida durante meus trabalhos, aos demais estagiários, bem como aos mestrandos e doutorandos que me passaram muitos ensinamentos, obrigada pela amizade.

Obrigada ao meu namorado Sidney Vasconcelos que por várias vezes me ajudou em meus trabalhos, disponibilizando seu tempo para me dar a total atenção.

Aos meus amigos que são peças importantes no meu desenvolvimento pessoal e profissional também.

À todos que participaram de alguma forma nessa caminhada, sintam-se agradecidos por tudo que você me passaram durante esses anos.

SUMÁRIO

RESUMO	i
1.INTRODUÇÃO	1
1.1 IMPORTÂNCIA ECONOMICA.....	3
1.2 BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DE BACURIZEIRO.....	4
1.3 MARCADORES MOLECULARES.....	5
2. OBJETIVO	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1 COLETA DO MATERIAL.....	8
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL	8
3.3 GENOTIPAGEM USANDO MARCADORES MOLECULARES.....	10
3.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4.1 DIVERSIDADE GENÉTICA	12
4.2 ANÁLISE DE AGRUPAMENTO.....	15
4.3 ESTRUTURA GENÉTICA.....	18
5. CONCLUSÃO	20
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

RESUMO:

O bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) é uma espécie frutífera nativa da Amazônia muito utilizada na cultura alimentar nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, nas formas de sucos, doces, sorvete, geléias, licores e *in natura*. Devido a sua grande importância econômica, é necessária a conservação da espécie em Bancos Ativos de Germoplasma (BAG) para apoiar programas de melhoramento genético e para realizar a caracterização dos acessos a fim de conhecer a variabilidade conservada. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi quantificar a variabilidade genética acessos de bacurizeiro pertencentes ao BAG da Embrapa Amazônia Oriental por meio de marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). Foram coletadas 78 amostras de bacurizeiros pertencentes a 16 progênies coletadas em dois locais diferentes da Ilha do Marajó, PA. Das 16 progênies, sete foram coletadas em Soure e nove em Salvaterra. Os 78 indivíduos foram coletados genotipados por 23 *primers* ISSR pré-selecionados. Após a análise, com os *primers*, obteve-se 121 produtos amplificados, dos quais 57 foram polimórficos, sendo que os *primers* mais polimórficos foram o UBC 834, UBC 899 e UBC 900. Já os *primers* UBC810 e UBC884 não apresentaram bandas polimórficas. A AMOVA entre e dentro de progênies identificou maior diversidade dentro de progênies (95%), bem como mostrou haver maior polimorfismo dentro dos locais de coleta (97%) do que entre eles, demonstrando alta similaridade entre as amostras de bacurizeiro do BAG da Embrapa da Amazônia Oriental sediadas em Tomé Açu de acordo com marcadores moleculares ISSR.

1. INTRODUÇÃO

O bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) é uma espécie frutífera nativa da Amazônia muito utilizada na cultura alimentar na região Norte e Nordeste de diversas formas, como sucos, doces, sorvete, geleias, licores e *in natura* (Homma *et al.*, 2010). A fruta do bacuri já começa a ganhar espaço entre os produtos que vão para o mercado fora da região devido a crescente preferência do consumidor por estes tipos de frutas tropicais conhecidos por apresentar aromas e sabores incomuns e/ou com propriedades nutricionais melhoradas, principalmente os produtos da região amazônica como o cupuaçu e a castanha do Brasil. Devido a sua grande importância econômica, há uma necessidade de seleção de genótipos produtivos e adaptados às condições locais, evidenciando a importância de conservação dessas espécies em Bancos Ativos de Germoplasma (BAG) e programas de melhoramento (Gusmão *et al.*, 2006).

Apesar da sua grande importância, muito ainda precisa ser feito em relação à caracterização, avaliação de germoplasma e melhoramento genético visando o cultivo e o manejo das espécies de bacurizeiro (Souza *et al.*, 2001). Muitos trabalhos morfológicos de bacurizeiros são encontrados na literatura, porém trabalhos com marcadores moleculares ainda são escassos e os acessos do BAG da Embrapa Amazônia oriental ainda não possuem um trabalho de caracterização genética com marcadores moleculares. Trabalho similar foi realizado por Souza *et al.*, (2013) com BAG de Bacurizeiro da Embrapa Meio Norte.

O ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) é um marcador dominante que amplifica regiões entre microssatélites, sendo utilizados na estimativa da diversidade e estrutura genética populacional (Ikegami *et al.*, 2009; Christopoulos *et al.*, 2010; Dje *et al.*, 2010). Esses marcadores são ótimos indicadores para estudos de populações onde a caracterização molecular ainda é pouco conhecida, como no caso do bacurizeiro.

Quando os acessos apresentam marcadores comuns, significam semelhança genética entre eles, e quando esses marcadores são incomuns, significam diferenças genéticas. Assim, essas semelhanças e diferenças genéticas entre acessos de determinado banco de germoplasma permite gerar grande quantidade de informação, como a diversidade genética e a relação filogenética

desses acessos (Faleiro, 2007). Dessa forma o trabalho teve como objetivo quantificar a variabilidade genética entre acessos de bacurizeiros do BAG da Embrapa da Amazônia Oriental por meio de marcadores moleculares ISSR.

1.1. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

O bacurizeiro é uma fruta nativa da região amazônica do Brasil, mas encontra-se bastante distribuído por grande parte da América do Sul. Esta planta pode ser encontrado nas Guianas, indo até o Paraguai, encontrado também no Equador, Peru e Colômbia de forma rara e em mata primária (Ferreira, *et al*, 1987). No Brasil essa espécie ocorre no Nordeste brasileiro, como no Maranhão e Piauí, onde forma povoamentos densos e de forma secundária, chegando aos estados de Tocantins e Mato Grosso (Guimarães *et al.*, 1992; Carvalho, 2007). No estado do Pará, este fruto é encontrado na região do Nordeste, raramente na microrregião em Tomé-Açu e Guamá; na Ilha do Marajó ele apresenta em grande ocorrência e na região metropolitana de Belém ocorre na Ilha de Mosqueiro, Outeiro e na região de Barcarena (Nascimento *et al*, 2007).

Segundo Homma *et al.* (2010), o mercado dessa fruta amazônica era bastante restrito ao consumo local e ao período de safra, mas com a exposição da região para as demais áreas do Brasil, por meio das redes de comunicação, esse produto passou a ganhar destaques no mercado em outras regiões brasileiras, e com o aumento da procura pela polpa de bacuri houve o superfaturamento do produto, principalmente na comercialização da polpa, enquanto em 2005 o valor de um quilo da polpa era de 10 reais, passou para aproximadamente 20 reais, em 2010.

Menezes *et al.* (2011) afirmam que a polpa do bacuri é comercializada de forma congelada nas redes de supermercado das regiões produtoras a preços superiores aos de outras frutas tropicais como, por exemplo, o cupuaçu, o cajá a goiaba e a graviola. Além disso, grandes fornecedores da polpa da fruta encaminham o produto para sorveterias de Belém, como a Cairu, onde ocorre grande procura pelo sorvete desta fruta tão exótica (Homma *et al.*, 2010).

A fruta *in natura* é comercializada nas CEASA e em feiras livres de Belém-Pa, São Luís- Ma e em Teresina-Pi, onde atende a grande demanda de consumidores locais, e essa grande procura faz com que este tipo de comercialização fique restrito as regiões produtoras devido ao sistema de produção ser ainda quase totalmente extrativo, dificultando, assim, um sistema mais amplo de comercialização para outros mercados nacionais (Menezes, 2011; Souza *et al.*, 2001). A partir da semente do bacuri pode-se extrair o óleo, sendo este usado para

fazer sabão, curar doenças de pele e no preparo de remédios cicatrizantes (Braga, 1976; Nascimento *et al.*, 2007). Uma produção bastante recente com o bacuri é a cerveja, a qual recebeu prêmio nacional e internacional, sendo hoje considerada uma das melhores cervejas do mundo e que está sendo comercializada em grande parte da Europa (Homma *et al.*, 2007).

A árvore do bacurizeiro já teve mais importância como espécie madeireira do que planta frutífera. Com a sua madeira é bem resistente e de coloração clara, por apresentar características físico-mecânica e de multiplicidade de uso, pode ser bastante utilizada na construção de casas, embarcações pesadas, ripas e estacas (Homma *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2007). Homma *et al.* (2007) explicam que a madeira do bacuri é utilizada em obras hidráulicas, na construção civil, naval e também, na fabricação de alguns tipos de móveis domésticos e industriais. Vasconcelos *et al.* (2001) ainda afirmam que a madeira possui alta resistência ao ataques de fungos apodrecedores e moderada resistência ao ataque de cupins.

Apesar de apresentar grande importância na alimentação humana, ainda há pouco conhecimento científico sobre essa espécie, principalmente com relação a caracterização molecular. Destaca-se também a importância desse estudo na conservação de coleções de germoplasma para o conhecimento dos níveis de diversidades.

1.2. BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DE BACURIZEIRO

Um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) representa uma coleção ativa de acessos que é rotineiramente usada para propósitos de pesquisa, caracterização, avaliação e utilização de recursos genéticos. (Faleiro, 2007)

A Embrapa Amazônia Oriental, nos últimos anos, tem coletado e mantido em condições *ex situ* em Banco Ativo de Germoplasma diversos acessos de bacurizeiro oriundos do estado do Pará, em especial da Ilha do Marajó, obtidos de Soure e Salvaterra. Guimarães (1992) descreve o programa de coleta desses acessos para se estabelecer o banco ativo de germoplasma de bacurizeiro com o objetivo de realizar a conservação de materiais com variabilidade genética, mantida

“ex situ”, assim construindo uma população base para o programa de melhoramento genético.

Como a exploração ainda é feita de forma extrativista e existem poucas informações na literatura sobre a diversidade genética dessa espécie, é indispensável a realização de estudos que contribuam para direcionar estratégias que favoreçam a sua conservação, avanços no processo de domesticação e no melhoramento (Homma *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2001)

No BAG do bacuri são realizados estudos para aperfeiçoar seu cultivo e manejo, como por exemplo a forma de propagação da espécie, por sementes, estacas de ramos, produção de mudas e enxertos (Carvalho & Müller, 2007).

Dessa forma destaca-se a importância de manter *ex situ* plantas para conservação de suas características fenotípicas e genotípicas por apresentarem grande importância para base do conhecimento e melhorar a sua produtividade. Também para ser feita estudos morfológicos e genéticos, como os realizados com marcadores moleculares para identificação de diversidade genética.

1.3. MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores moleculares são empregados em estudos de variabilidade genética devido aumentarem a eficiência da amostragem de genótipos, apresentando assim, entre outras vantagens, citar a obtenção de um número quase ilimitado de polimorfismo genético (Faleiro, 2007). Ainda segundo este autor, as informações adquiridas com as análises moleculares podem complementar as informações morfológicas dos acessos, contribuindo para aumentar a eficiência do planejamento dos cruzamentos e a seleção de genótipos com características desejadas em programas de melhoramento genético. O conhecimento da variabilidade genética é importante no direcionamento de cruzamentos visando à obtenção de populações segregantes com potencial na seleção de novas variedades.

Vários melhoristas têm adotado as ferramentas de marcadores moleculares para auxiliar nos trabalhos de melhoramento, entre outras, para caracterização de germoplasma. Entre os marcadores mais precisos e confiáveis estão os ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), pois são de fácil operação, não

exige uso de enzima de restrição e são de bastante utilidade nos trabalhos de distância genética entre acessos parentais (Santos *et al.*, 2013). O ISSR consiste em uma técnica rápida, simples e que gera menos custos em comparação às outras técnicas. Os marcadores não necessitam de um pré conhecimento do genoma do material a ser estudado (Vijayan, 2005), por isso são bastante eficientes ao estudo do bacurizeiro. Os marcadores ISSR representam um exemplo de técnica utilizada para avaliação de diversidade que tem sido um sucesso, bem como em estruturação de populações intra-específicas (Chai *et al.*, 2010; Lahoz *et al.*, 2011).

ISSR são regiões do genoma que estão localizadas entre locos adjacentes de regiões microssatélites e são geradas por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando um iniciador (*primer*), que possui uma longa sequência de nucleotídeos de alta temperatura de anelamento que aumenta a precisão da amplificação e melhora a reprodutibilidade (Faleiro, 2007).

Em bacurizeiro a variabilidade fenotípica é bastante visível, mas a caracterização genética das espécies ainda foi pouco estudada. O estudo pioneiro com a variabilidade genética do bacurizeiro usando marcadores moleculares foi com Almeida *et al.* (2007), onde foi utilizado marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) para a caracterização da variabilidade. Segundo Meloni *et al.* (2006), os marcadores moleculares ISSR são apropriados para uso em espécies onde as informações genéticas ainda não foram desvendadas, como é o caso do bacurizeiro.

Souza *et al.*, (2013) realizou um estudo com marcadores moleculares ISSR o qual utilizou 72 genótipos de bacurizeiro, oriundo de 10 populações do BAG da Embrapa Meio Norte coletados de 10 áreas de ocorrência da espécie no nordeste.

Poucos trabalhos moleculares foram feitos com o bacurizeiro para conhecer a variabilidade genética existente no BAG, ou em floresta primária, é importante para o manejo e o extrativismo do fruto, voltado ao interesse do mercado.(Souza *et al.*, 2013) Assim, há necessidade em selecionar as plantas matrizes de melhor qualidade e fornecer aos produtores das regiões material básico para a produção (Silva *et al.*, 2009). Entretanto, para ser feita essa seleção, uma alternativa é a utilização de características fenotípicas, que apresente como ponto

essencial para esse processo a obtenção de parâmetros de alta herdabilidade para ser ter um satisfatório ganho genético das espécies (Oliveira & Fernandes, 2001)

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi quantificar a variabilidade genética entre e dentro de acessos de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) do BAG da Embrapa da Amazônia Oriental, localizada no Campo Experimental de Quatro Bocas, Tomé-Açu, PA, por meio de marcadores ISSR.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COLETA DO MATERIAL

Foram coletadas amostras de 78 acessos de bacurizeiro pertencentes a 16 progênies distintas coletadas na Ilha do Marajó, PA (Tabela 1). Foram coletadas de 4 a 5 plantas por progênies em dois locais distintos da ilha, 7 progênies coletadas em Soure e 9 progênies coletadas me Salvaterra. As plantas encontram-se sediadas em Tomé-Açú, no Campo Experimental de Quatro Bocas da Embrapa da Amazônia Oriental. As folhas de bacurizeiro foram coletadas manualmente, mantidas conservadas em gelo e levadas ao Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Amazônia Oriental em Belém, Pará, e armazenadas em freezer -80°C até o momento da extração.

3.2. EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

A extração do DNA total foi realizada no Laboratório de Genética da Embrapa Amazônia Oriental. O DNA foi extraído das folhas segundo o método de Doyle & Doyle (1990). As folhas das amostras foram maceradas com nitrogênio líquido e polivinilpirrolidona e, ao macerar, foi adicionado 3 ml de tampão de extração CTAB (CTAB 2%, NaCl 5M, EDTA 0,5 M, PVP, Tris-HCl 1M e água estéril), vortexado e encubado em banho-maria à 65°C por uma hora, agitados de 10 em 10 minutos. Após esse tempo, foi acrescentado a solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) foram homogeneizadas manualmente por 120 vezes e centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm. Ao retirar o sobrenadante foi adicionado neste 1 ml de álcool 95% gelado e retornado a centrifuga por mais 10 minutos a 10.000 rpm. Posteriormente, foi realizada a lavagem do precipitado com álcool 70% e centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm. Após essa etapa foi feita a secagem do DNA por pelo menos 24 horas e então ressuspendido em TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) acrescido de RNase, para a degradação do RNA e obtenção somente do DNA total. Este DNA foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio para a quantificação e comparado com as bandas de DNA do fago lambda nas concentrações de 50, 100 e 200 ng.µl⁻¹. O

DNA foi diluído a uma concentração de 10 ng/μl no volume de 100 μl.

Tabela 1 – Lista dos 78 acessos de bacurizeiro das 16 progênie coletados na Ilha do Marajó mantidos no banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental e utilizados na caracterização molecular por marcadores ISSR.

Ordem Acessos	Progênie	Planta	Local Coleta	Ordem Acessos	Progênie	Planta	Local Coleta
1	1	1	Soure, PA	40	8	5	Salvaterra, PA
2	1	2	Soure, PA	41	9	1	Salvaterra, PA
3	1	3	Soure, PA	42	9	2	Salvaterra, PA
4	1	4	Soure, PA	43	9	3	Salvaterra, PA
5	1	5	Soure, PA	44	9	4	Salvaterra, PA
6	2	1	Soure, PA	45	9	5	Salvaterra, PA
7	2	2	Soure, PA	46	10	1	Salvaterra, PA
8	2	3	Soure, PA	47	10	2	Salvaterra, PA
9	2	4	Soure, PA	48	10	3	Salvaterra, PA
10	2	5	Soure, PA	49	10	5	Salvaterra, PA
11	3	1	Soure, PA	50	11	1	Salvaterra, PA
12	3	2	Soure, PA	51	11	2	Salvaterra, PA
13	3	3	Soure, PA	52	11	3	Salvaterra, PA
14	3	4	Soure, PA	53	11	4	Salvaterra, PA
15	3	5	Soure, PA	54	11	5	Salvaterra, PA
16	4	1	Soure, PA	55	12	1	Salvaterra, PA
17	4	2	Soure, PA	56	12	2	Salvaterra, PA
18	4	3	Soure, PA	57	12	3	Salvaterra, PA
19	4	4	Soure, PA	58	12	4	Salvaterra, PA
20	4	5	Soure, PA	59	13	5	Salvaterra, PA
21	5	1	Soure, PA	60	13	1	Salvaterra, PA
22	5	2	Soure, PA	61	13	2	Salvaterra, PA
23	5	3	Soure, PA	62	13	3	Salvaterra, PA
24	5	4	Soure, PA	63	13	4	Salvaterra, PA
25	5	5	Soure, PA	64	14	5	Salvaterra, PA
26	6	1	Soure, PA	65	14	2	Salvaterra, PA
27	6	2	Soure, PA	66	14	3	Salvaterra, PA
28	6	3	Soure, PA	67	14	4	Salvaterra, PA
29	6	4	Soure, PA	68	14	5	Salvaterra, PA
30	6	5	Soure, PA	69	15	1	Salvaterra, PA
31	7	1	Soure, PA	70	15	2	Salvaterra, PA
32	7	2	Soure, PA	71	15	3	Salvaterra, PA
33	7	3	Soure, PA	72	15	4	Salvaterra, PA
34	7	4	Soure, PA	73	15	5	Salvaterra, PA
35	7	5	Soure, PA	74	16	1	Salvaterra, PA
36	8	1	Salvaterra, PA	75	16	2	Salvaterra, PA
37	8	2	Salvaterra, PA	76	16	3	Salvaterra, PA
38	8	3	Salvaterra, PA	77	16	4	Salvaterra, PA
39	8	4	Salvaterra, PA	78	16	5	Salvaterra, PA

3.3. GENOTIPAGEM USANDO MARCADORES MOLECULARES

Os acessos de bacurizeiro foram genotipados com 18 *primers* de ISSR UBC desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC), Vancouver, Canadá e previamente selecionados por Souza *et al.* (2013) e mais seis *primers* selecionados por amplificarem bandas em outras espécies vegetais. Os *primers* foram submetidos a um teste utilizando acessos de bacuri aleatórios do BAG para selecionar a melhor temperatura de anelamento, a fim de obter a visualização precisa das bandas geradas pela PCR, posteriormente, foi realizada a PCR para todos os demais acessos (Tabela 2).

Tabela 2. Identificação dos 24 *primers* ISSR, temperatura de anelamento (Ta) e sequência dos *primers* selecionados para análise ISSR.

<i>Primer</i>	Temperatura °C	Sequência (5'-3')
UBC 807	57	(AG) ₇ GT
UBC 808	57	(AG) ₈ C
UBC 809	57	(AG) ₈ G
UBC 810	53	(GA) ₈ T
UBC 811	54	(GA) ₈ C
UBC 817	53	(CA) ₈ A
UBC 825	54	(AC) ₇ A
UBC 826	59	(AC) ₈ C
UBC 827	59	(AC) ₈ G
UBC 834	53	(AG) ₈ YT
UBC 840	54	(GA) ₈ YT
UBC 842	52	(GA) ₈ YG
UBC 847	57	(CA) ₈ RC
UBC 856	59	(AC) ₈ YA
UBC 866	58	VDV(CT) ₇
UBC 868	58	(GAA) ₆
UBC 884	57	HBH(AG) ₇
UBC 888	59	BDB (CA) ₇
UBC 889	57	DBD (AC) ₇
UBC 890	59	VHV (GT) ₇
UBC 891	59	HVH (TG) ₇
UBC 899	57	CATGGTGTGGTCATTGTTCC
UBC 900	53	ACTTCCCCACAGGTTAACACA

Após a seleção dos *primers*, foram feitos ajustes para os componentes da PCR. O mix utilizado conteve para cada amostra 2,0x PCR buffer, 1,5 mM de dNTP,

1,2 mM de $MgCl_2$, 2,0 μM do *primer*, 10 ng de DNA, 1 mg. μl^{-1} de BSA (Albumina Soro Bovino) e uma unidade da enzima Taq DNA polimerase. Após o ajuste, foram utilizados os *primers* com os 78 acessos de bacurizeiro. As reações foram amplificadas em termociclador, programa segundo Souza et al.(2013) com alterações que consiste com uma fase inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguidas de 35 ciclos, sendo cada ciclo com 1 minuto para desnaturação a 95°C; 45 segundos para anelamento a 52 - 59°C, dependendo do *primer* a ser utilizado, e 2 minutos para extensão a 72°C. A extensão final foi realizada a 72°C por cinco minutos. Após finalizar esse processo, cada mix foi armazenado no freezer a -20°C até serem submetidos à eletroforese.

Os produtos da reação foram separados em eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio e TBE 1X. As corridas foram realizadas em voltagem de 80 V por 3 horas e 30 minutos. As imagens foram visualizadas em transilumador de luz ultravioleta e fotodocumentadas digitalmente e os fragmentos amplificados foram comparados com o marcador molecular DNA Ladder de 1 KB (Invitrogen, Brasil).

3.4. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

As imagens foram analisadas e a partir da ausência ou presença de bandas dos fragmentos amplificados foi construída uma matriz binária, onde os dados na forma de 1 (presença da banda) e 0 (ausência da banda) foram analisados nos programas GENES (Cruz, 2008) e PAST (Hammer *et al.*, 2001), sendo gerada matriz de similaridade genética (sg_{ij}) baseada no coeficiente de Jaccard por meio da expressão:

$$Sg_{ij} = \frac{a}{a + b + c}$$

onde:

a = número de casos em que ocorre a presença da banda em ambos os indivíduos, simultaneamente;

b = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo i;

c = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo j;

O dendrograma gerado para a análise de similaridade foi baseado no método de agrupamento UPGMA por meio do programa PAST (Hammer *et al.*, 2001) e o ponto de corte foi estabelecido de acordo com a média das similaridades genéticas. A relação entre matriz de similaridade e o dendrograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética (r), conforme Sokal & Rohlf (1962). Desta forma, observou-se o polimorfismo e a similaridade genética entre as amostras de bacurizeiro do BAG da Embrapa Amazônia Oriental.

A estrutura genética foi estipulada por meio da análise de variância molecular – AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992). Foram utilizadas duas abordagens: Primeiro, foi realizada a análise entre e dentro das dezesseis progênies. Posteriormente, foram analisados os grupos de acordo com as origens das progênies, baseando-se em seus locais de coleta, Salvaterra ou Soure, ambas na Ilha do Marajó, estado do Pará.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DIVERSIDADE GENÉTICA

Foram amplificados 121 produtos com os 23 *primers* utilizados, sendo a média de, aproximadamente, 5 bandas por *primer*. O *primer* UBC834 apresentou maior número de bandas, com 10 locos amplificados (Figura 1), enquanto os UBC 842, UBC 847 e UBC 868 amplificaram 3 bandas cada. Entre os 121 produtos amplificados, 57 foram polimórficos, correspondendo a 47% dos locos, com média de 2,4 locos polimórficos por *primer*, demonstrando pouco polimorfismo entre acessos. Os *primers* mais polimórficos foram o UBC 834, UBC 899 e UBC 900, com 5 polimorfismos cada, com destaque para o *primer* UBC 899 apresentou 100% das bandas polimórficas. Por outro lado, UBC810 e UBC884 não apresentaram bandas polimórficas.

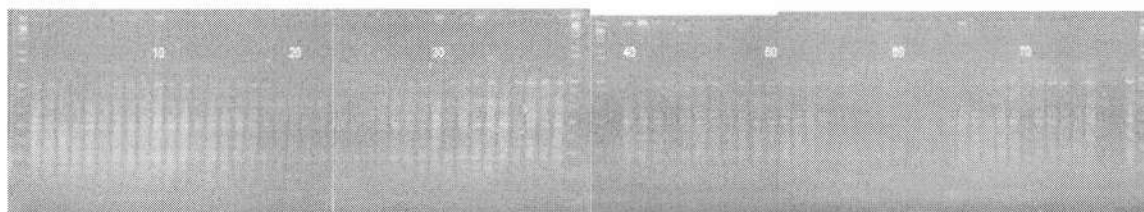


Figura 1. Amplificação do *primer* ISSR UBC834 com as bandas polimórficas em 78 indivíduos de bacurizeiro pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental. As numerações nas figuras indicam a ordem dos acessos de 1 a 78.

Souza *et al.* (2013) encontrou em acessos de bacurizeiro da coleção de germoplasma da Embrapa Meio-Norte 236 locos com 18 *primers* ISSR, sendo desse total, 221 foram locos polimórficos, apresentando, assim, grande diversidade genética entre estes acessos, tal como o *primer* UBC 810 que apresentou 21 locos dos quais 20 apresentaram-se polimórficos. Um dos motivos para ser encontrado esse resultado estar relacionado ao fato do autor ter submetido os produtos da amplificação ao gel de agarose corado à 1,5% com Gel Red (Biotium) que foi utilizado previamente neste presente trabalho. Ao comparar os resultados gerados pela PCR com um *primer* em gel de agarose corado com Gel Red e com gel de agarose corado com brometo de etídio, observou-se que as bandas que possuíam tamanhos diferentes quando observadas em gel de agarose com Gel Red, na verdade possuíam mesmo tamanho quando aplicados em gel de agarose corado com brometo de etídio. Estes resultados indicam que o uso de determinados reagentes podem influenciar os resultados. Podemos levar em consideração também que os autores também utilizaram um número menor de amostras (72 genótipos de bacurizeiro) e um número maior de locais de coleta (10 áreas distintas de coleta).

Em outros trabalhos também foram encontrados um número considerável de locos amplificados com *primers* ISSR e altas taxas de polimorfismo, como em amendoim da subespécie *hypogaeae* e *fastigiata* (Santos *et al.*, 2013); em graviola da espécie *Anonas muricata* L. (Lima *et al.*, 2009.); em umbu-cajazeira da espécie *Spondias* sp., (Santana *et al.*, 2011) em biribazeiro da espécie *Rollinia mucosa* [Jacq.] Baill (Lorenzoni *et al.*, 2014) e em *Lippia alba* Mill (Verbenaceae) (Manica-Cattani *et al.*, 2009).

Tabela 3 – *Primers* utilizados na genotipagem de 78 indivíduos de bacurizeiro pertencentes ao BAG da Embrapa Amazônia Oriental e suas respectivas quantidades de locos, total de polimorfismo e taxa de polimorfismo de cada.

Primer	Total de locos	Total de locos polimorficos	Taxa de polimorfismo (%)
UBC 807	5	3	60
UBC 808	5	3	60
UBC 809	4	4	100
UBC 810	4	0	0
UBC 811	6	4	66,6
UBC 817	5	1	20
UBC 825	5	3	60
UBC 826	5	1	20
UBC 827	4	1	25
UBC 834	10	5	50
UBC 840	5	1	20
UBC 842	3	1	33,3
UBC 847	3	3	100
UBC 856	8	4	50
UBC 866	4	3	75
UBC 868	3	1	33,3
UBC 884	8	0	0
UBC 888	7	1	14,2
UBC 889	5	1	20
UBC 890	5	3	60
UBC 891	6	4	66,6
UBC 899	5	5	100
UBC 900	6	5	83,3
TOTAL	121	57	

Em trabalhos com guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) foi encontrado uma quantidade de polimorfismo próximo ao encontrado neste trabalho, também utilizando marcadores ISSR (Sousa, *et al.* 2012; Silva, *et al.*, 2012). Nascimento Filho *et al.* (2011) em seus resultados baseados em certas características indica que a diversidade genética entre clones de guaraná não é grande, sendo o mesmo material usado no trabalho de Sousa *et al.* (2012).

No caso do bacurizeiro, há poucos trabalhos referentes à essas diversidades baseados em caracteres fenotípicos. Almeida *et al.* (2007) em seu trabalho com bacurizeiro utilizando marcadores moleculares RAPD, encontrou elevado nível de polimorfismo nos acessos estudados, bem como foi possível

detectar alta taxa de similaridade entre os genótipos, que foram de regiões diferentes.

4.2. ANÁLISE DE AGRUPAMENTO

Os valores de similaridade genética entre os acessos de bacurizeiros do BAG da Embrapa Amazônia Oriental variaram entre 0,5 e 0,98, com média de 0,8 de similaridade. Os acessos mais distantes foram o 215-PL01 e o 101-2, com 0,5 de similaridade, e os acessos mais próximos foram 216-PL4 e 104-4, mostrando 0,98 de similaridade. Apesar da maior similaridade genética entre os acessos 216-PL4 e 104-4, estes pertencem a progênes diferentes. Além disso, estes acessos foram coletados em locais diferentes, sendo o 216-PL4 coletado no município de Salvaterra, enquanto o 104-4 foi coletado em Soure. Desta forma, observou-se que há similaridade genética entre acessos de locais e progênes diferentes. Por outro lado, os acessos citados acima como os menos similares foram igualmente coletados em municípios distintos, bem como pertencem a progênes diferentes.

Observou-se alta similaridade genética entre os acessos 107-5 e 210-2 valor de 0,96, assim como entre os acessos 209-3 e 211-2 no valor de 0,97. Neste ultimo caso ambos os acessos foram coletados no município de Salvaterra, porém não pertencem a mesma progênie.

Com base nesses dados, observa-se que o ISSR não foi capaz de separar materiais derivados de semente. Sousa *et al.* (2012) encontraram um valor similar a estes, com uma variação de 0,65 a 0,99 de coeficiente de similaridade. Silva *et al.* (2001) afirmam que a diversidade geográfica não está diretamente relacionada com a diversidade genética, e que acessos que são da mesma região geográfica podem ser divergentes, bem como acessos de regiões diferentes podem possuir o mesmo genótipo.

No dendrograma de similaridade genética constituído a partir dos 57 locos polimórficos pode se visualizar alta similaridade entre as amostras das progênes (figura 2). Foi estipulado um corte no dendrograma baseado na média de similaridade encontrada de acordo com o coeficiente de Jaccard ($S_{gx} = 0,8$). O ponto de corte pode ser estabelecido visualmente pelo autor do trabalho e/ou de acordo com o interesse do trabalho (Yamaki *et al.*, 2008 & Metz & Monard, 2007).

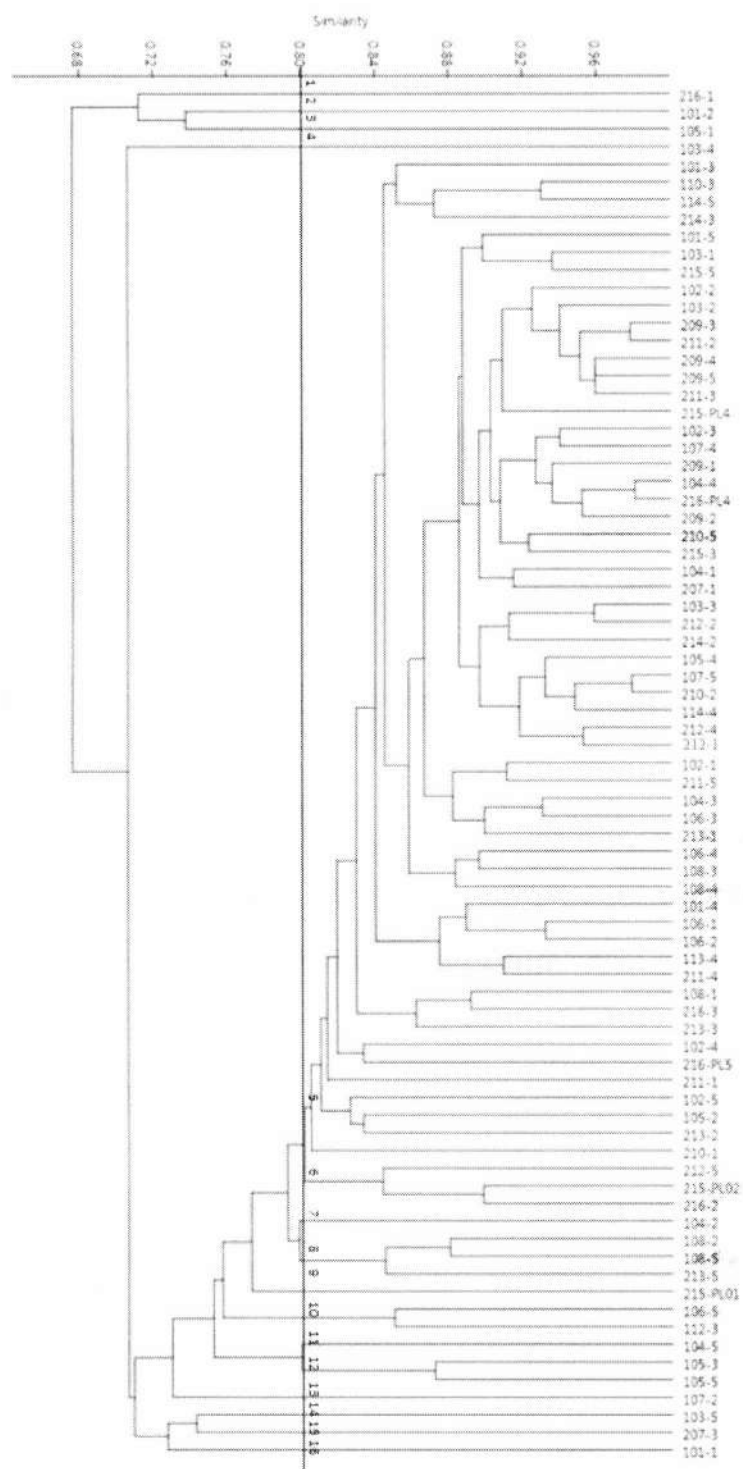


Figura 2. Dendrograma de similaridade genética gerado método UPGMA com as 78 amostras de bacurizeiro (*Platonia Insignis* Mart.) do banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental. Ponto de corte $sgx=0,8$.

A partir da análise do dendrograma com base no ponto de corte, observou-se a formação de dezesseis grupos, sendo que onze indivíduos formaram grupos isolados, representados pelos acessos 216-1, 101-2, 105-1, 103-4, 104-2, 215-pl01, 104-5, 107-2, 103-5, 207-3, 101-1 (Figura 2). O grupo 5 formou o maior grupo com vários subgrupos. Os grupos 6 e 8 foram formados por três acessos e os grupos 10 e 12 ficaram representados por dois acessos cada.

Dos onze acessos isolados, a maioria é do município de Soure, incluindo as progênies 004, 007 e 001, onde cada uma ficou representada por dois acessos, sendo eles os 104-5 e 104-2, 107-2 e 207-3 e 101-1 e 101-2, respectivamente. Destes onze acessos, somente os 216-1 e o 215-pl01 são de origem da região de Salvaterra.

Os grupos 6 e 8 foram formados por três acessos cada. Todos os acessos do grupo 6 foram coletados em Salvaterra, sendo que não pertencem as mesmas progênies. O grupo 8 apresentou dois acessos de Salvaterra, pertencentes à mesma progênie.

Os grupos 10 e 12 foram formados por dois acessos cada. O grupo 10 apresenta acessos oriundos de duas progênies diferentes, sendo a 006 proveniente de Soure e a 012 proveniente de Salvaterra. O grupo 12 é formado por dois acessos provenientes da progênie 005 do município de Soure.

No maior grupo identificado como grupo 5, dois acessos da mesma progênie apresentaram-se próximos, são os acessos 212-4 e 212-1, com o valor de similaridade de 0,95 e ao acessos 106-1 e 106-2, com o valor de similaridade de 0,93

Esta análise de agrupamento tem a finalidade de unir em grupos, de acordo com o objetivo do trabalho, com a sua homogeneidade ou sua heterogeneidade, ou, como no caso do presente trabalho, de acordo com os indivíduos (Yamaki, *et al.*, 2008; Albuquerque, *et al.*, 2006; Liden, 2009). A correlação cofenética foi de $r=0,87$, um valor alto e significativo apresentando boa confiabilidade já que os valores r maiores ou iguais à 0,56 são considerados ideais para os valores de similaridade genética (Bussad *et al.*, 1990; Vaz Patto *et al.*, 2004). Valores similares foram encontrados também em Souza *et al.* (2013) e

Lorenzini *et al.* (2014) que obtiveram $r = 0,79$ e à Santana *et al.* (2011) que obtiveram $r = 0,83$.

4.3. ESTRUTURA GENÉTICA

Pela AMOVA, obteve-se coeficiente de diferenciação genética entre progênes $\Phi_{ST} = 0,055$, $P < 0,0001$ onde segundo Solé-Cava (2001), os valores superiores a 0,05 são considerados indicadores de alta estruturação populacional, enquanto que valores abaixo de 0,05 indicam baixa estruturação populacional. Nessa análise obteve-se 5% de variação total entre as progênes e 95% da diversidade foi encontrada dentro de progênes de bacurizeiros (tabela 4)

Souza *et al.* (2013) também encontraram alta diversidade genética dentro de populações de bacurizeiro da Embrapa Meio-Norte (71,82%) em relação à variabilidade entre populações (28,18%). Deve-se levar em consideração que neste trabalho, os autores obtiveram uma abrangente área de coleta desses materiais. Bertoni *et al.* (2010) também encontraram a maior parte da variabilidade nos seus estudos em *Mandevilla velutina*, com 81,25% de variabilidade genética intrapopulacional para 18,75% interpopulacional.

Tabela 4. Análise da variância molecular (AMOVA) considerando estruturação genética entre e dentro de progênes e entre e dentro de locais de coleta dos 16 progênes de bacurizeiro genotipadas com marcadores ISSR.

Fonte de variação	GL	Variância	Variação (%)	P	Φ_{ST}
Entre progênes	15	0,2584	5,4984	0,0001	0,055
Dentro de progênes	62	4,4414	94,5016		
Entre locais de coleta	1	0,1324	2,7851		0,0279
Dentro de locais de coleta	76	4,6203	97,2149		

Uma outra análise foi realizada agrupando indivíduos do mesmo local de origem onde também foi encontrada uma variação maior dentro da mesma origem do que entre origens. O coeficiente de diferenciação genética entre populações de acordo com os locais de coleta foi de $\Phi_{ST} = 0,0279$, $P < 0,0001$. A variação entre populações foi de 2,8% para o valor de 97,2% para dentro de locais de coleta e obtiveram um grau de significância de 5%.

Estas espécies perenes apresentam essa diversidade maior dentro do que entre populações devido a uma possível influência das características biológicas sobre elas, como o sistema reprodutivo e a história das espécies que alteram o nível da diversidade genética e a variabilidade entre e dentro das populações (Hamrick *et al.*, 1991; Loveless & Hamrick, 1984).

Almeida *et al.* (2007) após suas análises com marcadores RAPD, concluíram que a maior parte da variabilidade genética encontra-se dentro de populações de bacurizeiro, independente da distância geográfica existente.

5. CONCLUSÃO

Os acessos de bacurizeiro do BAG da Embrapa Amazônia Oriental apresentam alta similaridade genética detectada por marcadores moleculares ISSR.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, M.A.de; FERREIRA, R.L.C.; SILVA, J.A.A.; SANTOS, E.S., STOSIC, B.; SOUZA, A.L. de. Estabilidade em análise de agrupamento: estudo de caso em ciência florestal. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.30, n.2, p.257-265, 2006
- ALMEIDA, H.J.S.; COSTA, J.T.A.; BENBADIS, A.K.; INNVECCO, R.; ALOUFA, M.A.I; CARVALHO, A. C. P. P. Aplicação de marcador molecular (RAPD) para estudos da diversidade genética em bacurizeiro. In: **Bacuri: Agrobiodiversidade** LIMA, M. da C. organizadora. São Luís: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, .157-170, 2007.
- BRAGA, R. **Plantas do nordeste especialmente do Ceará**. Mossoró: ESAM, 540 p, 1976
- BERTONI BW; SOUZA AV; BIONDO R; FRANÇA SC; TELLES MPC; PEREIRA MAS.. Genetic diversity among natural populations of *Mandevilla velutina*. **Horticultura Brasileira** 28: 209-213. 2010
- BUSSAD, W.O.; MIAZAKI, E.S.; ANDRADE, D.F. **Introdução à análise de agrupamentos**. ABE, São Paulo 105p, 1990
- CARVALHO, J.E.U. & MÜLLER, C.H. Propagação do bacurizeiro. In: **Bacuri: Agrobiodiversidade** LIMA, M. da C. organizadora. São Luís: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, 210p. 2007
- CARVALHO; J.E.U.; Aspectos botânicos, origem e distribuição geográfica do Bacurizeiro. . In: **Bacuri: Agrobiodiversidade** LIMA, M. da C. organizadora. São Luís: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, 2007.
- CHAI, X.; CHEN, S.L.; XU, W. Using inter-simple sequence repeat markers to analyze the genetic structure of natural *Pteroceltis tatarinowii* populations and implications for species conservation. **Plant Systematics Evolution**, v.285, p. 65-73, 2010.
- CHRISTOPOULOS, M.V.; ROUSKAS, D.; TSANTILI, E.; BEBELIC, P.J. Germplasm diversity and genetic relationships among walnut (*Juglans regia* L.) cultivars and Greek local selections revealed by Inter-Simple Sequence Repeat(ISSR) markers. **Scientia Horticulturae**, v.125, p.584-592, 2010.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Diversidade Genética**. Editora UFV. Viçosa (MG). 278p. 2008

DJE, Y.; TAHI, C.G.; BI, A.L.Z.; BAUDOUIN, J.P.; BERTIN, P. Use of ISSR markers to assess genetic diversity of African edible seeded *Citrullus lanatus* landraces. **Scientia Horticulturae**, v.124, p.159-164, 2010.

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

EXCOFFIER, L., SMOUSE, P.E., QUATTRO, J.M.. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** 131: 479-491. 1992

FALEIRO, F. G. **Marcadores genéticos moleculares aplicados a prgramas de conservação e uso de recursos genéticos**, Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 102p, 2007.

FERREIRA, F.R.; FERREIRA, S.A.N.; CARVALHO, J.D.U. Espécies frutíferas pouco exploradas, com potencial econômico e social para o Brasil. Revista Brasileira de Fruticultura, v.9, p.11-22, 1987.

GUIMARÃES, A.D.G.; MOTA, M.G. da C.; NAZARE, R.F.R. de. Coleta de germoplasma de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) na Amazônia I. Microrregião Campos do Marajó (Soure/Salvaterra). Belém: EMBRAPA-CPATU. **Boletim de Pesquisa**, 132, 23p, 1992.

GUSMÃO, E.; VIEIRA, F. de A.; FONSECA JÚNIOR, E. M. da. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex. A. Juss). **Cerne**, v.12, p.84-91, 2006.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**, v.4, p.1-9, 2001.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W.; MURAWSKI, D.A.; LOVELESS, M.D. Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. In: **Genetics and conservation of rare plants**. FALK, D.A.S., HOLSINGER, K.E. (editores) Oxford University Press, Oxford, pp 75–86, 1991.

HOMMA, A.K.O. ; CARVALHO, J.E.U; MENEZES, A.J.E.A. Bacuri: fruta amazônica em ascensão. **Ciência Hoje**, v. 46, p. 40-45, 2010

HOMMA, A.K.O.; MATOS, G.B.de; MENEZES, A.J.E.A.de Manejando a planta e o homem: O bacurizeiro do nordeste paraense e da ilha do Marajó. **Amazônia: Ciência & Desenvolvimento**, Belém, v. 2, n. 4, jan./jun. 2007.

IKEGAMI, H.; NOGATA, H.; HIRASHIMA, K.; AWAMURA, M.; NAKAHARA, T. Analysis of genetic diversity among European and Asian fig varieties (*Ficus carica* L.) using ISSR, RAPD, and SSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.56, p.201-209, 2009.

LAHOZ, I.; FERNÁNDEZ, J.A.; MIGLIARO, D.; MACUA, J.I.; EGEA-GILABERT, C. Using molecular markers, nutritional traits and field performance data to characterize cultivated cardoon germplasm resources. **Scientia Horticulturae**, v.127, p.188-197, 2011.

LORENZONI, R.M., SOARES, T.C.B., SANTIAGO, V.F, SILVA, J.A.da, COELHO, R.I., Utilização de marcadores ISSR na avaliação da divergência genética entre acessos de biribazeiro. v. 36, **Revista Brasileira de Fruticultura** p. 251-257, 2014

LOVELESS, M.D & HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 1984, 15: 65–95p, 1984.

LIMA, E. N. ; CAVALCANTE, J. J. V. ; OLIVEIRA, F. I. C.CIO, F. ; Jose Emilson ; MAGALHAES, C. H. C. . Variabilidade genética de gravioleira identificada por marcadores ISSR. **IV Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**, O melhoramento e os novos cenários da agricultura, Guarapari, 2009.

LINDEN, R. Técnicas de Agrupamento **Revista de Sistemas de Informação da Faculdade Salesiana Maria Auxiliadora**, Macaé – RJ, n. 4, pp. 18-36, 2009

MANICA-CATTANI, M.F., ZACARIAS, J., PAULETTI, G., ATTI-SERAFINI, L.; Echeverrigaray, S. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers **Brazilian Journal of Biology**, v. 69(2), p. 375-380, 2009

MELONI, M.; PERINI, D.; FILIGHEDDU, R.; BINELLI, G. Genetic variation in five mediterranean populations of *Juniperus phoenicea* as revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. **Annals of Botany**, v.97, p.299-304, 2006.

METZ, J. & MONARD, M.C. Utilizando uma abordagem híbrida para interpretação do clustering hierárquico, **III Workshop em Algoritmos e Aplicações de Mineração de Dados**, anais, 2007

MENEZES, A. J. E. A. de; HOMMA, A. K. O.; SCHÖFFEL, E. R.; FILGUEIRAS, G. C. A comercialização do bacuri pela agricultura familiar no nordeste paraense e ilha do Marajó, no Pará in: **VI SOBER Nordeste Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural** Petrolina, anais, 2011.

NASCIMENTO FILHO, F. J. do; ATROCH, A. L.; REGAZZI, A. J. Avaliação de características de mudas de clones de guaranazeiro utilizando análise de fatores. **Revista de Ciência Agrárias**, Belém, PA, v. 54, n. 2, p. 107-112, 2011.

NASCIMENTO, W. M. O. do; CARVALHO, J. E. U.; MULLER, C. H.; de. Ocorrência e distribuição geográfica do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 3, p. 657-660, Dezembro 2007

OLIVEIRA, M.S.P & FERNANDES, G.L.C. Repetibilidade de caracteres do cacho de açaizeiro nas condições de Belém-Pa **Revista Brasileira de Fruticultura Jaboticabal** - SP, v. 23, n. 3, p. 613-616, 2001

SANTANA, I.B.B., OLIVEIRA, E.J., SOARES FILHO, W.S., RITZINGER, R., AMORIM, E.P., COSTA, M.A.P.C., MOREIRA, R.F.C. VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE UMBU-CAJAZEIRA MEDIANTE ANÁLISE DE MARCADORES ISSR **Revista Brasileira de Fruticultura**., Jaboticabal - SP, v. 33, n. 3, p. 868-876, 2011

SANTOS, R.C.dos; QUEIROZ, C.M.; BATISTA, V.G.L.; SILVA, C.R.C.; PINHEIRO, M. P. N.; ARROXELAS, A.L.; MELO FILHO, P. A; LIMA, L.M. de, Variabilidade de progênies F2 de amendoim geradas por meio de seleção de genitores ISSR-divergentes, **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 3, p. 578-586, 2013

SILVA, E.F.da; SOUSA, N.R.; SILVA, G.Fda; NASCIMENTO-FILHO, F.J.do; HANADA, R.E.; FERNANDES, J. S., Diversidade genética entre genótipos de guaranazeiro utilizando marcadores entre microssatélite, 2012, disponível em <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/76081/1/448.docnelcimar.pdf>, acessado em novembro 2014.

SILVA, R.G.; CHAVES, M.C.L. ; MOURA, M.C.C.L., ARNHOLD, E.; CRUZ, C.D. Repetibilidade e correlações fenotípicas de caracteres do fruto de bacuri no Estado do Maranhão **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 4, p. 587-591, 2009.

SOLÉ-CAVA AM. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI SR. (ed.) **Biologia Molecular e conservação**, Ribeirão Preto: Editora Holos, p.172-192 2001.

SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, Utrecht, v.11, p.30-40, 1962.

SOUZA, N.R.; SILVA, G.F.da; NASCIMENTO FILHO, F.J.; ATROCH, A.L Diversidade genética do guaranazeiro por meio de RAPD e ISSR. **XXII congresso brasileiro de fruticultura**, anais, Bento Gonçalves – RS, 2012

SOUZA, V.A.B.; ARAÚJO, E.C.E.; VASCONCELOS, L.F.L.; LIMA, P.S. da C. Variabilidade de características físicas e químicas de frutos de germoplasma de bacuri da Região Meio-Norte do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, p.677-683, 2001

SOUZA, I.G.B.; SOUZA, V.A.B. ; LIMA, P.S.C. Molecular characterization of *Platonia insignis* Mart. (Bacurizeiro) using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p. 3835-3845, 2013.

VASCONCELOS, F.J.; FREITAS, J.A.; LIMA, V.M.O.C.; MONTEIRO, L.V.; PEREIRA, S.J. **Madeiras tropicais de uso industrial do Maranhão: características tecnológicas**. Manaus: INPA, São Luiz: UFMA, . 96p, 2001

VAZ PATTO, M.C, SATOVIC, Z.; PÊGO, S.; FEVEREIRO,P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markes. **Euphytica**, v. 137, p. 63-72, 2004

VIJAYAN, K. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Polymorphism and Its Application in: Mulberry Genome Analysis **International journal of Industria Entomology** Vol. 10, No. 2, pp. 79~86, 2005

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of population**. University of Chicago Press, Chicago, 580p, 1978.

YAMAKI, M.; MENEZES, G.R.O., TEIXEIRA, R.B., BARBOSA, L.; PAIVA, A.L.C., TORRES, R.A. Divergência genética entre linhagens de matrizes de corte por meio de análise de agrupamento **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.5, p.829-833, 2008