

Diversidade genética em germoplasma de *Anacardium occidentale*

A.V.C. Silva¹; E.N. Muniz¹; A.S. Ledo¹; A.R.C.Rabbani²; J.A.E. Amorim³, M.F. Vitória²

¹Embrapa Tabuleiros Costeiros, 49025080, Aracaju-SE, Brasil

²Departamento de Engenharia Agrônômica, Universidade Federal de Sergipe, 49900000, São Cristóvão-SE, Brasil

³Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais, Universidade Federal de Sergipe, 49900000, São Cristóvão-SE, Brasil

ana.veruska@embrapa.br

(Recebido em 26 de novembro de 2013; aceito em 20 de outubro de 2014)

Com o decréscimo da produtividade do cajueiro e a maior exigência do mercado para a qualidade dos seus produtos torna-se necessário conhecer e avaliar a base genética disponível para potencializar a seleção de genótipos superiores. Com o objetivo de avaliar a diversidade genética entre clones do Banco Ativo de Germoplasma de Cajueiro, foi desenvolvido o presente trabalho, utilizando marcadores RAPD. A menor distância genética foi verificada entre o cajueiro CJ5 (AO) e CJ9 (T1C18), e a maior, entre CJ1 (BRS226) e CJ17 (P2O1). Os marcadores RAPD são eficientes na caracterização molecular do cajueiro, sendo possível quantificar a variabilidade genética entre os clones e a pré-seleção de grupos a partir do método de agrupamento UPGMA e ACoP.

Palavras-chave: caju, marcadores moleculares, variabilidade

Genetic diversity in cashew germplasm

The decrease in productivity of cashew in Brazil and the increased market demand for the quality of their products lead to the necessity to understand and evaluate the genetic base available to enhance the selection of superior clones. The aim of this work was to assess the genetic diversity among clones of the Germplasm Bank of cashew using RAPD markers. The smallest genetic distance was observed among clones CJ5 (AO) and CJ9 (T1C18) and the higher between CJ1 (BRS226) and CJ17 (P2O1). The percentage of polymorphism was 94.75%, indicating high genetic variability among the clones evaluated. RAPD markers were efficient in the molecular characterization of the cashew tree, being able to measure the genetic variability among clones and pre-selection of groups using UPGMA and PCoA methods.

Keywords: cashew, molecular markers, variability

1. INTRODUÇÃO

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma das principais frutíferas cultivadas no Brasil, destacando-se no contexto socioeconômico pelo alto valor nutritivo e comercial de seus produtos. No Nordeste a cultura apresenta grande relevância, pois é responsável por uma média de 50 mil empregos diretos, sendo 15 mil na indústria e 35 mil no setor rural¹⁶, e viabiliza diversas agroindústrias através do beneficiamento da castanha, produção de sucos, sorvetes, doces, licor, mel, geleias, cajuína, refrigerantes gaseificados, e aguardentes, gerando divisas para a Região.

A produção mundial de castanha de caju é em torno de 270.294 toneladas⁹. Segundo dados de 2011, o Brasil é o quinto maior produtor com 230 mil toneladas, atrás do Vietnã (1.272.000), Nigéria (813.023), Índia (674.600) e Costa do Marfim (452.656)¹³. Do que é produzido no país, quase a totalidade é oriunda da Região Nordeste (99%) destacando-se os

estados do Ceará (165.143 toneladas), Piauí (50.562 toneladas) e Rio Grande do Norte (41.808 toneladas)⁹.

O mercado consumidor de pedúnculo *in natura* é crescente e exigente em frutos que apresentem alta resistência ao manuseio, formato piriforme e frutos de coloração laranja e vermelha¹⁴. Nos países importadores de frutas, a falta de conhecimento do valor nutritivo do pedúnculo tem sido o principal motivo para o seu baixo consumo. Entretanto, embora o caju alcance preços elevados nos principais centros de consumo brasileiros, o pedúnculo ainda não oferece retorno econômico para a maioria dos produtores, pois apenas 5% da produção é industrialmente aproveitada².

Apesar da sua importância, esta cultura tem apresentado um significativo decréscimo da produtividade dos pomares, que já foi de 570 kg ha⁻¹ de castanhas em 1978³ e nos últimos anos tem sido de 137 kg ha⁻¹ (9), com repercussão em toda a cadeia, desde o segmento produtivo à industrialização, pela falta de matéria-prima de qualidade para a indústria. Desta forma, há necessidade de reverter este quadro, para aumentar o lucro do setor produtivo e evitar ameaças à viabilidade deste agronegócio.

Vários estudos foram desenvolvidos para a obtenção de genótipos de cajueiro que permitissem não só o aumento da produtividade, como também a melhoria da qualidade da castanha para a indústria e o aproveitamento do pedúnculo. Diversos clones de genótipos superiores foram obtidos pelo programa de melhoramento genético do cajueiro da Embrapa Agroindústria Tropical. Porém existem poucos genótipos comerciais de cajueiro anão-precoce, todos com a base genética excessivamente estreita que os originou⁴, caracterizando claramente uma situação de vulnerabilidade genética. Torna-se assim imprescindível, a caracterização genotípica desses materiais através da utilização de marcadores moleculares, não só para a sua identificação, mas, principalmente, para avaliar a divergência genética entre eles, informação importante no direcionamento dos cruzamentos deste programa.

O primeiro trabalho utilizando marcadores moleculares em DNA de cajueiro foi descrito por Silva Neto et al.²³ Nesse estudo, os autores concluíram que a utilização de marcadores RAPD na identificação de clones de cajueiro anão precoce era viável e que a técnica poderia ser empregada em análises de germoplasma da espécie. Mneney et al.¹⁴ realizaram estudos para avaliar a diversidade genética, baseada em marcadores RAPD, de acessos originários da Tanzânia, Sri Lanka, Moçambique, Índia, Brasil e Ilhas Cook. Os autores verificaram que acessos brasileiros formaram um grupo separado e mais distinto em relação às outras procedências. Utilizando o mesmo marcador molecular, Dhanaraj et al.¹¹ estimaram a diversidade genética entre 90 acessos do Banco Nacional de Genética do Cajueiro da Índia de moderada a alta. Rabbani et al.²¹ estudaram oito cajueiros comerciais no Ceará por meio de marcadores RAPD e verificaram correlações morfológicas entre os grupos formados pelo método UPGMA e ACoP.

O decréscimo da produtividade e a maior exigência do mercado para a qualidade dos seus produtos têm levado o programa de melhoramento genético do cajueiro a procurar novos genótipos. Desta forma, torna-se necessário conhecer e avaliar a base genética disponível de forma a possibilitar a seleção de genótipos superiores e, assim, ampliar as oportunidades de obter genótipos melhorados para as características desejadas.

Diante da importância econômica da espécie, esse trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar a variabilidade genética de 20 acessos de cajueiros provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Agroindústria Tropical.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram avaliados 20 acessos de cajueiro, oriundos do Banco de Germoplasma do Centro Nacional de Pesquisa da Agroindústria Tropical (CNPAT/EMBRAPA), localizado em Pacajus, CE. (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação dos acessos de cajueiros pertencentes ao Banco de Germoplasma do Centro Nacional de Pesquisa da Agroindústria Tropical (CNPAT/EMBRAPA).

Acesso	Código
BRS 226	CJ1
BRS 189	CJ2
CCP 09	CJ3
CCP 76	CJ4
AO	CJ5
BRS 265	CJ6
T2C21	CJ7
P200	CJ8
T1C18	CJ9
EMBRAPA 50	CJ10
B3098	CJ11
T3C26	CJ12
H276-1	CJ13
PRO 555-1	CJ14
EMBRAPA 51	CJ15
CCP 06	CJ16
P201	CJ17
T5C30	CJ18
CCP 1001	CJ19
T6C31	CJ20

Amostras de folhas jovens foram usadas para extração de DNA¹², e a concentração de DNA foi quantificada em espectrofotômetro Nanodrop. Cada reação PCR constou de 50 ng de DNA, tampão PCR (Gibco®) 1X; MgCl₂ 1,5 mM; dNTP 0,2 mM; 2,0 U Taq DNA polimerase (Gibco®), 0,3 ng de primer; água milli-Q filtrada q.s.p. 20 µL. As amostras foram amplificadas utilizando termociclador (Eppendorf®, modelo Mastercycle com gradiente de temperatura) e submetidos a um ciclo de 94°C por um minuto; 92°C por um minuto; 35°C por um minuto; 92°C por um minuto; 35°C por um minuto; 72°C por dois minutos; 40 vezes (92°C por um minuto; 35°C por um minuto; 92°C por um minuto; 35°C por um minuto; 72°C por dois minutos) e, finalmente, um ciclo de 72°C por cinco minutos²².

Foram avaliados 12 primers (Tabela 2) constituídos por 10 pares de base da IDT (*Integrated DNA Technologies, Germany*). Em cada tubo contendo 20µL do DNA amplificado foram adicionados 3µL de corante (azul de bromofenol 0,01%; glicerol 40%). Dessa mistura, 10µL foram analisados em gel de agarose 1,5% (dissolvida em TEB 1X – TRIS 89mM, ácido bórico 89nM, EDTA 2,5mM, pH 8,3) e submetidos a eletroforese horizontal, com uma tensão de 100V por 90 minutos. A coloração foi feita usando brometo de etídio na concentração de 5µL 100mL⁻¹ de gel, e de 10µL mL⁻¹ no tampão de eletrodo (TEB 1X). A visualização dos resultados, após a eletroforese, foi realizada em equipamento Gel-doc 1000 Bio Rad (Bio-Rad Laboratories SA, EUA) de fotodocumentação para as análises posteriores.

A similaridade genética foi estimada pelo coeficiente de Jaccard. Para formação de agrupamentos utilizou-se o método UPGMA (Unweigh Pair-Group Method Arithmetic Average). Foram obtidas 3000 amostras bootstrap, utilizando o programa FreeTree¹⁹. Para a construção do dendrograma, foi utilizado o programa TreeView¹⁷. Os erros associados às similaridades foram estimados²⁵. Também foi realizado o agrupamento das amostras considerando o método de Análise de Coordenadas Principais (ACoP) com auxílio do software XLSTAT¹.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 12 primers utilizados amplificaram um total de 87 fragmentos de DNA, sendo que 82 apresentaram polimorfismo (94,75%), variando entre três, com o primer IDT12, e 12 com o primer IDT5. Este percentual foi superior ao encontrado por Chavan e Raut (2014), que foi de 63,33% entre 11 genótipos da região de Vidarbha, Índia. Os produtos de amplificação foram utilizados para o cálculo do grau de similaridade genética entre os acessos (Tabela 2).

Tabela 2. Relação dos iniciadores selecionados, com suas respectivas seqüências, número de fragmentos polimórficos (NFP) gerados e porcentagem de polimorfismo (%).

Iniciador	Seqüência 5' – 3'	NFP
IDT03	GTT TCG CTC C	7
IDT04	TGA TCC CTG G	4
IDT05	TTC GAG CCA G	12
IDT06	GTG AGG CGT C	6
IDT07	ACC GCG AAG G	11
IDT08	GGA CCC AAC C	9
IDT09	CCC AAG GTC C	4
IDT10	GGT GCG GGA A	4
IDT12	GAG GAT CCC T	3
IDT14	GGC ACT GAG G	7
IDT15	GGT CGG AGA A	8
IDT18	CCC GGC ATA A	7
Total de Bandas Polimórficas		82
Total de Bandas Polimórficas (%)		94,75%

De acordo com o coeficiente de similaridade de Jaccard (Tabela 3) sendo representado pelo dendrograma (Figura 1). A média da similaridade genética entre os clones estudados foi de 0,47 ($\pm 0,05$) (Tabela 3). Os acessos mais divergentes entre si foram os acessos CJ1 e CJ17 ($0,26 \pm 0,05$) e as mais similares foram as CJ5 e CJ9 ($0,75 \pm 0,05$).

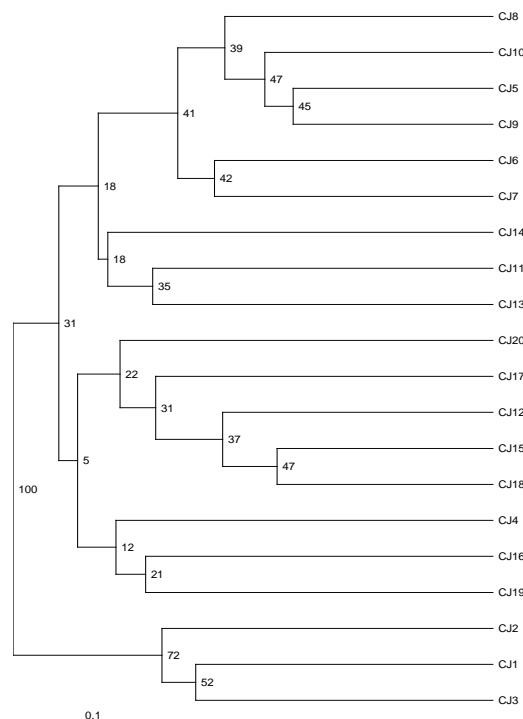


Figura 1. Dendrograma de similaridade genética gerado pelo agrupamento UPGMA e análise de bootstrap (%) entre 20 acessos de cajueiros pertencentes ao Banco de Germoplasma do Centro Nacional de Pesquisa da Agroindústria Tropical (CNPAT/EMBRAPA).

Tabela 3. Similaridade genética (%) (abaixo da diagonal) e erro estimado (acima da diagonal) entre 20 acessos de cajueiros.

	CJ1	CJ2	CJ3	CJ4	CJ5	CJ6	CJ7	CJ8	CJ9	CJ10	CJ11	CJ12	CJ13	CJ14	CJ15	CJ16	CJ17	CJ18	CJ19	CJ20
CJ1	#	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
CJ2	0,58	#	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
CJ3	0,63	0,59	#	0,06	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05	0,06	0,06
CJ4	0,46	0,51	0,52	#	0,06	0,06	0,05	0,06	0,06	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05	0,06	0,06	0,05	0,06	0,06	0,06
CJ5	0,46	0,38	0,43	0,52	#	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,05	0,06	0,05	0,06
CJ6	0,49	0,41	0,52	0,52	0,60	#	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,05	0,06	0,06	0,06
CJ7	0,48	0,35	0,42	0,42	0,64	0,65	#	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
CJ8	0,46	0,35	0,42	0,52	0,68	0,60	0,61	#	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	0,05	0,06	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06
CJ9	0,40	0,38	0,40	0,49	0,75	0,52	0,64	0,68	#	0,05	0,05	0,06	0,06	0,05	0,06	0,06	0,05	0,06	0,06	0,06
CJ10	0,47	0,43	0,44	0,41	0,71	0,60	0,62	0,64	0,71	#	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06
CJ11	0,31	0,31	0,30	0,37	0,52	0,40	0,48	0,46	0,59	0,60	#	0,06	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05
CJ12	0,34	0,31	0,38	0,46	0,49	0,52	0,54	0,55	0,46	0,44	0,49	#	0,06	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,06	0,06
CJ13	0,31	0,35	0,39	0,36	0,49	0,46	0,54	0,46	0,55	0,53	0,57		#	0,05	0,06	0,06	0,05	0,05	0,06	0,05
CJ14	0,38	0,39	0,43	0,40	0,49	0,46	0,51	0,43	0,59	0,56	0,46	0,39	0,57	#	0,05	0,06	0,05	0,05	0,06	0,05
CJ15	0,35	0,36	0,40	0,43	0,43	0,54	0,52	0,50	0,47	0,45	0,41	0,71	0,47	0,38	#	0,06	0,05	0,05	0,06	0,06
CJ16	0,41	0,39	0,49	0,56	0,49	0,49	0,48	0,59	0,49	0,42	0,41	0,61	0,55	0,43	0,57	#	0,05	0,06	0,06	0,06
CJ17	0,26	0,34	0,33	0,33	0,36	0,42	0,45	0,39	0,39	0,38	0,37	0,52	0,41	0,37	0,62	0,40	#	0,05	0,06	0,06
CJ18	0,37	0,40	0,38	0,48	0,45	0,55	0,53	0,51	0,45	0,46	0,34	0,61	0,43	0,34	0,73	0,51	0,59	#	0,06	0,05
CJ19	0,38	0,42	0,43	0,50	0,41	0,53	0,46	0,47	0,44	0,45	0,44	0,50	0,47	0,47	0,55	0,57	0,47	0,56	#	0,06
CJ20	0,42	0,40	0,44	0,44	0,48	0,55	0,50	0,55	0,44	0,52	0,36	0,51	0,40	0,39	0,53	0,45	0,44	0,66	0,45	#

Foi possível identificar a formação de dois grandes grupos com 100% de bootstrap. O primeiro foi de CJ4 a CJ20. O acesso CJ4 (CPP76) é de cajueiro-anão precoce¹⁸ e apresenta como característica principal um pedúnculo de cor laranja, com amplo mercado para consumo *in natura*. O segundo, formado por CJ2 (BR 189), CJ1 (BR 226), CJ3 (CCP 09), que também são acessos de cajueiro-anão precoce e apresentam o pedúnculo de cor amarela, vermelho claro e laranja, respectivamente, sendo produtores de castanha e fruta para consumo *in natura*¹⁸.

No método de agrupamento AcoP, verifica-se que os dois primeiros componentes (dos 20 totais), explicam 39,41% da variação (Figura 2). Para a explicação de mais de 81% de variação entre os genótipos, seriam necessários oito componentes. A contribuição dos componentes restantes, individualmente, foi de menos que 5% cada.

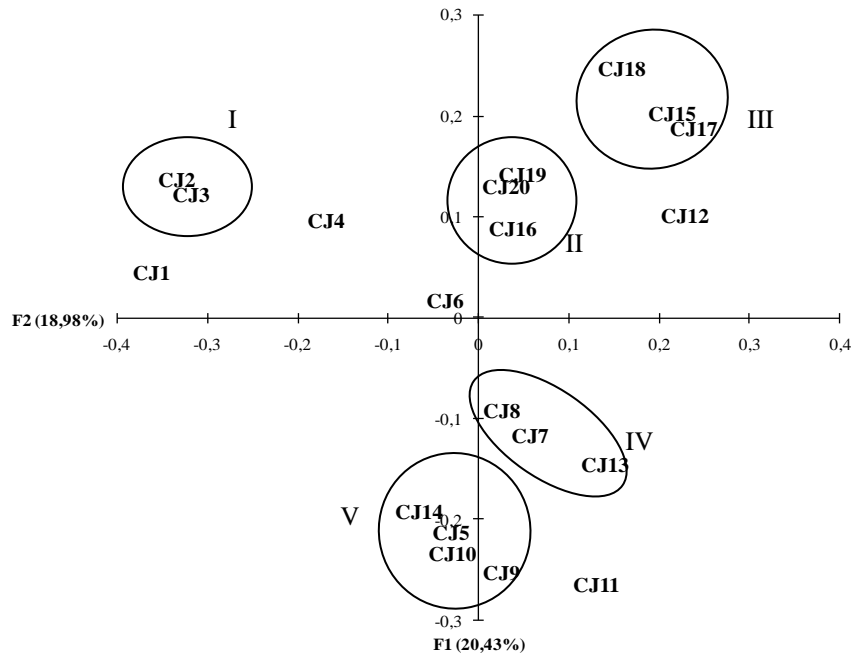


Figura 2. Análise das Coordenadas principais (ACoP) para cajueiros pertencentes ao Banco de Germoplasma do Centro Nacional de Pesquisa da Agroindústria Tropical (CNPAT/EMBRAPA).

Os cinco grupos identificados pela ACoP foram: (I) CJ2 (BRS 189) e CJ3 (CCP 09); (II) CJ19 (CCP 1001), CJ20 e CJ16 (CCP 06); (III) CJ18, CJ15 (Embrapa 51), CJ17; (IV) CJ8, CJ7, CJ13 e (V) CJ14, CJ5, CJ10 (Embrapa 50) e CJ9. Com base na similaridade genética média (SGM 0,81) em que todos os indivíduos foram divergentes entre si, analisando os dados pela análise ACP, percebeu-se que há formação de grupos, sendo que CJ1, CJ4, CJ6, CJ11, CJ11, apresentaram maior diversidade genética.

Em quatro dos cinco grupos houve a presença de pelo menos um clone comercial. O Embrapa 51 (CJ15) é produzido em sequeiro, apresenta resistência a resinose, e à antracnose e é moderadamente resistente ao mofo-preto^{5,6}. O CCP 06 (CJ16) apresenta maior resistência à antracnose e ao mofo-preto, sendo o clone mais plantado no Brasil, tanto em regime de sequeiro como fertirrigado⁷.

O polimorfismo gerado com os marcadores RAPD permitiu a certificação da identidade e determinação da variabilidade genética, poderão auxiliar o programa de melhoramento genético do cajueiro e a caracterização de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de cajueiro, devendo ser associado a estudos morfológicos, bem como a caracterização de fruto e pseudofruto.

4. CONCLUSÃO

Há uma ampla base genética no germoplasma de cajueiro avaliado, sendo possível mensurar a variabilidade genética entre acessos e a pré-seleção de grupos utilizando marcadores RAPD.

5. AGRADECIMENTOS

Ao pesquisador Dr. José Jaime Vasconcelos Cavalcanti (Embrapa Algodão), pelo envio do material vegetal.

-
1. Addinsolft. XLSTAT for Windows. Disponível em: <http://www.xlstat.com/>>. 2009.
 2. Alves RE, Filgueiras, HAC. Caju pós-colheita. Frutas do Brasil, Informação Tecnológica, 2. Brasília: Embrapa; 2002. 36p.
 3. Aquino ARL, Oliveira FNS, Rossetti AG, Leal TCAB. Levantamento de plantas daninhas na cultura do cajueiro nos Baixões Agrícolas Piauienses. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, (Série Embrapa – Comunicado técnico 89). Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/publica/pub/ComTec/cot_89.pdf> 2003
 4. Barros LM, Pimentel CRM, Corrêa MPF, Mesquita ALM. Recomendações técnicas para a cultura do cajueiro anão precoce. Fortaleza: Embrapa-CNPAT, 65p. (Série Embrapa - Circular Técnica 1). 1993. Disponível em: <http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_2493.pdf>
 5. Cardoso JE, Cavalcanti JJV, Cavalcante MJB, Aragão ML, Felipe EM. Genetic resistance of dwarf cashew (*Anacardium occidentale* L.) to anthracnose, black mold, and angular leaf spot. Crop Protection. 1999; 18(1): 23-27.
 6. Cardoso JE, Viana FMP, Cysne AQ, Farias FC, Sousa RNM. Clone Embrapa 51: uma alternativa para a resistência à resinose-do-cajueiro. Fortaleza: Embrapa CNPAT. (Série Embrapa – Comunicado técnico). 2007. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/home/down/index.php?pub/cot_130.pdf>
 7. Cavalcanti JJV, Cardoso JE, Barros LM, Felipe EM. Resistência genética de clone de cajueiro anão precoce às principais fitomoléstias. Boletim de Pesquisa. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2000. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Bp_034.pdf>
 8. Chavan SP, Raut UA. Genetic Diversity Based on Morphological And Molecular Markers in Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Genotypes. Vegetos – An International Journal of Plant Research. 2014; 26(2): 255-263. Disponível em: <<http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:vetos&volume=26&issue=2&article=036>>
 9. CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. (2014) - Castanha de caju. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_07_15_10_59_28_cajujunho2013.pdf> Acesso em 02 de outubro de 2014.
 10. Costa TS, Silva AVC, Lédo AS, Santos ARF, Silva Junior JF. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 2011; 46: 499-508.
 11. Dhanaraj AL, Bhaskara Rao EVV, Swamy KRM, Bhat MG, Teertha DP, Sondur SN. Using RAPDs to assess the diversity in Indian cashew (*Anacardium occidentale* L.) germplasm. Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 2002; 77: 41 – 47.
 12. Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 1991; 1: 13-15.
 13. FAO – Food and agriculture organization for the United Nations. (2013) - FAOSTAT. Disponível em : <<http://faostat3.fao.org/home/index.html#download>> Acesso em : 29 de julho de 2013.
 14. Mneney EE, Mantell SH, Bennett M. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to reveal genetic diversity within and between populations of cashew (*Anacardium occidentale* L.). Journal of Horticultural Science and Biotechnology; 2001, 76: 375–383.
 15. Moura CFH, Alves RE, Innecco R, Filgueiras HAC, Mosca JL, Pinto SAA. Características físicas de pedúnculos de cajueiro para comercialização *in natura*. Revista Brasileira de Fruticultura. 2001; 23(3): 537-540.
 16. Oliveira VH, Montenegro AA, Carbajal ACR, Mesquita ALM, Aquino ARL, Freire FCO, Araújo Filho GC, Paiva JR, Paz JS, Parente JIG, Mosca JL, Barros LM, Crisóstomo JR,

- Paula Pessoa PFA, Silveira SS. Cultivo do cajueiro-anão precoce. Sistemas de Produção. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2002. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Caju/CultivodoCajueiro/>>
17. Page RDM. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*. 1996; 12: 357-358.
 18. Paiva FFA, Garrutti DS, Silva Neto RM. Aproveitamento industrial do caju. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2000. 85p.
 19. Pavlicek A, Hrdá S, Flegl J. FreeTree – freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biology*. 1999; 45: 97-99.
 20. Pereira-Lorenzo S, Santos ARF, Ramos-Cabrer AM, Sau F, Díaz-Hernández MB. Morphological variation in local pears from north-western Spain. *Scientia Horticulturae*. 2012; 138: 176-182.
 21. Rabbani ARC, Silva AVC, Muniz EM, Ledo AS, Quirino ZBR. Diversidade genética entre cajueiros comerciais. *Scientia Plena*. 2012; 8: 1-8.
 22. Silva AVC, Martins ABG. Identificação de marcas moleculares associadas à ausência de sementes em videira. *Ciência Rural*. 2006; 36(3): 801-806.
 23. Silva Neto SP, Maruta I, Takaiwa F, Oono K, Matsumoto K. identification of cashew (*Anacardium occidentale* L.) seedlings with RAPD markers. In: International Symposium on Tropical Fruits. *Acta Horticulturae*. 1995; 370: 21-26.
 24. Silva AVC, Santos ARF, Wickert E, Silva Júnior JF, Costa TS. Divergência genética entre acessos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. 2011; 6(4):572-578.
 25. Skroch PW, Tivang J, Nienhuis J. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. *Proceedings of IUFRO International Conference*. Cali, 1992; 2(3): 23-30.
-