

Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineensis*

Kyvia Pontes Teixeira Chagas¹, Rodrigo Ferreira Sousa¹, Cristiane Gouvêa Fajardo¹, Fábio Almeida Vieira¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias, Laboratório de Genética e Melhoramento Florestal - Sala 26, RN 160, km 03, Distrito de Jundiá, CEP 59280-000, Macaíba-RN, Brasil. E-mail: kyviapontes@gmail.com; rodrigofsousa72@yahoo.com.br; genegoista00@gmail.com; vieirafa@gmail.com

RESUMO

Elaeis guineensis Jacq., Arecaceae, apresenta destaque econômico devido ao potencial oleífero, além de se situar entre as espécies com maior produtividade de biodiesel. A seleção de marcadores moleculares possibilita a caracterização genética populacional, subsidiando estratégias de conservação genética. O objetivo deste estudo foi a seleção de primers ISSR para quantificar a diversidade genética de uma população de *E. guineensis*. A amostragem envolveu 13 indivíduos na Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias, município Macaíba/RN. Foram selecionados seis primers, os quais geraram, ao todo, 68 locos, sendo 34 polimórficos. O número de alelos observados (N_a) foi igual a 1,5 e o número de alelos efetivos (N_e) foi igual a 1,3. A diversidade genética de Nei, assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi de 0,194 e o índice de Shannon (I) de 0,285. O teste de gargalo genético, conforme o modelo de passos de mutação (SMM) indicou a ocorrência significativa ($P < 0,007$) de um decréscimo populacional (*bottleneck*). A população apresentou baixa diversidade genética que pode ser explicada pelo gargalo genético, indicando redução no número de alelos.

Palavras-chave: Arecaceae, conservação genética, dendê

*Selection of ISSR markers and genetic diversity in a population of *Elaeis guineensis**

ABSTRACT

Elaeis guineensis Jacq., Arecaceae, features highlight due to potential for oil production as well as between species with greater productivity of biodiesel. The selection of molecular markers allows the characterization of population genetics, supporting strategies for genetic conservation. The aim of this study was the selection of ISSR primers to quantify the genetic diversity of a population of *E. guineensis*. Sampling involved 13 individuals in the Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias, municipality Macaíba/RN. Six primers were selected, they generated 68 loci, being 34 polymorphic. The number of alleles observed (N_a) was equal to 1.5 and the number of effective alleles (N_e) was equal to 1.3. The genetic diversity of Nei, assuming Hardy-Weinberg equilibrium was 0.194, and the Shannon index (I) of 0.285. The test of genetic bottleneck, according Stepwise Mutation Model (SMM), indicated the significant occurrence ($P < 0.007$) of a population decline (*bottleneck*). The population presented low genetic diversity, which may be explained by the genetic bottleneck, indicating reduction in number of alleles.

Key words: Arecaceae, genetic conservation, oil palm

Introdução

Arecaceae é considerada a terceira família botânica com maior influência econômica. Desta forma, os estudos envolvendo palmeiras vêm crescendo gradativamente em virtude da importância econômica e social visto que várias comunidades têm, como seu principal sustento, atividades relacionadas a plantios e usos secundários, como artesanato e alimentício (Jardim & Stewart, 1994). Entretanto, a exploração industrial das palmeiras ainda não sofreu intensificação em razão da necessidade de estudos aprofundados envolvendo as espécies com esses potenciais.

Elaeis guineensis Jacq., conhecida popularmente como dendê, é uma representante da família da Arecaceae de origem africana cujo cultivo ocorre na América Central, na América do Sul e na Ásia (Wahid, 2005). O destaque econômico desta espécie se deve à sua produtividade oleífera, pois a mesma possui elevada produção de óleo por unidade de área plantada. Quando considerada a eficácia na produção de óleo e a densidade energética, a *E. guineensis* está entre as espécies com maior potencial para a produção de biodiesel (Carvalho, 2009).

Com essas características a espécie é tida como fonte de energia alternativa renovável e uma opção ao diesel de petróleo. Seu óleo é extraído do fruto e da amêndoa, possuindo diversas utilizações na indústria farmacêutica e alimentícia, além da produção de biocombustíveis. Em geral, o óleo de palma, como é conhecido, apresenta diversas vantagens de potencialidade social, econômica e ecológica na matriz energética brasileira (Abreu, 2010).

Segundo Rolim et al. (2006), *E. guineensis* apresenta melhor desenvolvimento em regiões tropicais, nas quais predomina um clima quente e úmido, porém com elevados e bem-distribuídos índices pluviométricos ao longo do ano. Sua ocorrência é predominante em áreas de baixadas e com desníveis, o que auxilia no acúmulo de água e propicia um ambiente favorável para o desenvolvimento desta espécie.

Diversas atividades, como pecuária e monoculturas agrícolas, vêm reduzindo gradativamente as áreas naturais de ocorrência do dendê tornando ainda mais fundamental os estudos que possibilitem a conservação genética e ecológica desta espécie. Os estudos genéticos de espécies florestais são os principais instrumentos para se obter informações sobre as populações de uma mesma espécie subsidiando as pesquisas de caracterização dos aspectos ecológicos, como: o tipo de dispersão, agentes dispersores e estabelecimento de plântulas. Essas informações servem, ainda, para a compreensão de problemas na área de genética de populações, tais como endogamia e processos evolutivos, entre outros (Vieira & Carvalho, 2008; Silva et al., 2011).

Neste sentido, vários estudos que têm, como objetivo, analisar a variabilidade genética em populações, vêm utilizando os marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), pois são eficazes na detecção de polimorfismo, têm baixo custo, são abundantes no genoma e reprodutíveis entre laboratórios (Santana et al., 2011).

A seleção de primers funcionais é um pré-requisito para se obter as estimativas de diversidade genética de uma espécie. De acordo com Zietkiewicz et al. (1994) primers são

segmentos de ácidos nucleicos sintéticos, necessários para o início da replicação do DNA, constituídos geralmente por 15 a 20 bases nitrogenadas, em fita simples. No decorrer da Reação de Cadeia de Polimerase (PCR) o marcador ISSR gera fragmentos de tamanhos variados, denominados locos, os quais são posteriormente analisados via eletroforese.

Em suma, o presente estudo tem, como objetivo, a seleção de primers ISSR e a quantificação da diversidade genética em uma população remanescente de *E. guineensis*.

Material e Métodos

Local de estudo

Foram coletadas amostras foliares de 13 indivíduos representantes de uma população natural localizada na Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias (UECIA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), nas coordenadas 5°52'58" S e 35°21'47" N, no município de Macaíba, RN.

Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é tropical chuvoso, com verão seco e estação chuvosa no período de outubro, com precipitação média anual de 1.442,8 mm. A vegetação é típica de caatinga, com fragmentos de mata atlântica e o relevo apresenta planícies fluviais (Cestaro, 2002).

Extração de DNA e PCR

As amostras coletadas foram acondicionadas em tubos de 2 mL contendo 1 mL de CTAB 2X. O material foi armazenado em freezer a -20°C até o momento da extração.

O material foliar foi descongelado e utilizado para a extração do DNA pelo método CTAB, proposto por Doyle e Doyle (1987). Foram utilizados 100 mM de Tris pH 8,0; 1,4 M de NaCl; 20 mM de EDTA pH 8,0; 2% (p/v) CTAB; 1% (p/v) PVP-40 e 0,2% (v/v) de β -mercaptoetanol pré-aquecido a 60°C em banho maria; em seguida, foi realizada a quantificação do DNA por meio de gel de agarose a 1,0% e também com o uso de espectrofotômetro modelo Epoch™. O DNA foi, então, armazenado em freezer para uso posterior.

Nas reações de PCR foram utilizados 29 primers ISSR da Universidade de British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canadá), com comprimento entre 14 e 18 bases nitrogenadas e %CG entre 43 e 67%. A temperatura de anelamento utilizada foi de 47°C para todos os primers. O mix de PCR foi constituído de Buffer (10 X), BSA (1,0 mg ml⁻¹), MgCl₂ (50 mM), dNTP (2,5 mM), primer (2 μ M), Taq polimerase (U. μ l⁻¹), DNA (diluído 1:50) e água ultra pura, em um volume final de 12 μ l por amostra.

As PCRs foram realizadas em termociclador automático Veriti com bloco de 96 poços, no qual as amostras foram inicialmente, desnaturadas a 94 °C por 2 min, seguidos de 37 ciclos, iniciando-se com 15 segundos a 94 °C; em seguida 30 segundos a 47 °C e posteriormente 72 °C por 1 minuto; ao final de todos os ciclos o processo foi finalizado por 7 minutos a 72 °C e resfriado a 4 °C.

Eletroforese

Os DNAs amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com a utilização de corante GelRed™

e tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA). Utilizou-se marcador de DNA (ladder) de 100 pares de bases para estimar o tamanho molecular dos fragmentos amplificados. A eletroforese teve duração de duas horas e meia, em voltagem de 100 V.

Após a eletroforese os geis foram fotografados com o auxílio do sistema de fotodocumentação E-Box VX2, sob luz violeta. Os iniciadores foram, então, comparados para se identificar quais deles apresentaram o melhor perfil de amplificação.

Análises estatísticas

Os locos presentes nos geis foram classificados com a presença (1) e a ausência (0) para a construção da matriz binária utilizada nas análises estatísticas. Os parâmetros de diversidade genética, tais como porcentagem de locos polimórficos, número de alelos efetivos, número de alelos observados, diversidade genética de Nei e índice de Shannon foram calculados usando-se o programa POPGENE v.1.32 (Yeh et al., 1997).

A identidade e a distância genética de Nei (1978) foram obtidas através do programa POPGENE, que subsidiou a construção de um dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA (média aritmética não ponderada para agrupamento aos pares), com auxílio do programa NTSYS v.2.11 (Rohlf, 2000).

A fim de verificar o efeito de gargalo genético nas populações, isto é, diminuição significativa no decorrer dos anos foi usado o programa Bottleneck 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996). Utilizou-se, conjuntamente, para marcadores ISSR, o modelo de alelos infinitos (IAM), com base em Kimura & Crown (1964), e o modelo de passos de mutação (SMM), segundo Kimura & Otha (1978).

Resultados e Discussão

Marcadores ISSR

A metodologia aplicada mostrou-se eficiente para todos os marcadores que apresentaram DNA amplificado e locos, porém foram selecionados apenas os que possuíam número considerável de locos, além de uma boa resolução dos fragmentos (Figura 1).

Os seis iniciadores de ISSR selecionados neste estudo geraram ao todo 68 locos. O número de locos, conforme a

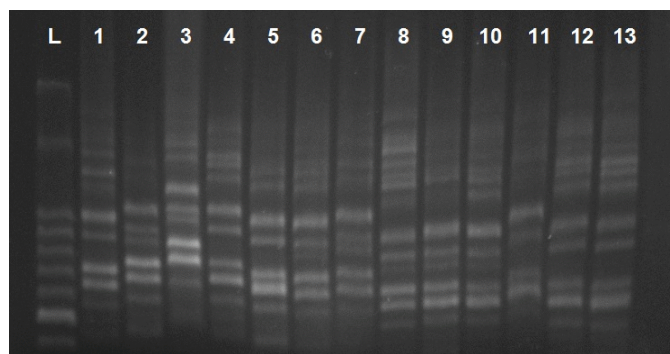


Figura 1. Padrão de fragmentos ISSR dos treze indivíduos de *Elaeis guineensis* com a utilização do primer UBC 827. L = Ladder, com cem pares de bases nitrogenadas

Tabela 1, variou entre 8 e 14 locos por iniciador, com média de 11,3.

Tabela 1. Iniciadores otimizados, sequência de nucleotídeos, porcentagem de guanina e citosina, temperatura de anelamento e número de locos

Primers ISSR	Sequência (5' - 3')	% GC	Ta (C°)	Locos
UBC 807 (AG)8-T	AGAGAGAGAGAGAGAGT	47	47,0	12
UBC 822 (TC)8-A	TCTCTCTCTCTCTCTCA	47	47,0	8
UBC 825 (AC)8-T	ACACACACACACACACT	47	47,0	11
UBC 826 (AC)8C	ACACACACACACACACC	53	47,0	9
UBC 827 (AC)8G	ACACACACACACACACG	53	47,0	14
UBC 857 (AC)8-YG	ACACACACACACACACYG	50	47,0	14

R= purina (A ou G) e Y = pirimidina (C ou T)

Santana et al. (2011) selecionaram, trabalhando com *Spondias* sp., 25 primers, os quais geraram 249 locos, com média de 10 fragmentos por primer. Já Gonçalves et al. (2014) também selecionaram, em estudos envolvendo *Erythrina velutina*, 11 primers, os quais geraram 149 locos. Ambos os estudos anteriores envolveram a diversidade genética de mais de uma população o que gera a necessidade de um número mais elevado de locos para quantificar a diferenciação genética entre áreas geográficas. Como o presente estudo envolve apenas uma população, o número de locos gerados foi considerado suficiente para discriminar os genótipos e quantificar a diversidade genética do local. Além disto, outros estudos têm revelado que é possível discriminar genótipos e populações com um número de locos variando entre 47 locos (Denduangboripant et al., 2010) e 70 locos (Brandão et al., 2011), sendo este último similar ao número de locos do presente estudo.

Os primers UBC 827 e UBC 857 foram os que mais apresentaram locos sendo que o UBC 857 já possui sua eficiência comprovada para algumas outras espécies (Duarte, 2011), sendo recomendado para outros estudos envolvendo seleção de primers ISSRs.

Diversidade genética populacional

Apenas 34 locos foram polimórficos, ou seja, 50%, sendo este valor considerado baixo para porcentagem de polimorfismo. O número de alelos (N_a) foi igual a 1,5 ($\pm 0,504$) e o número de alelos efetivos (N_e) foi igual a 1,338 ($\pm 0,384$).

A diversidade genética de Nei (1978, H_e), assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi de 0,194 ($\pm 0,210$) e o índice de Shannon (I) de 0,2850 ($\pm 0,3004$). De acordo com Pádua (2011) o valor do índice de Shannon pode variar entre 0 e 1, sendo 1 o ápice de diversidade de uma população; dessa forma, a população em estudo apresenta baixo nível de diversidade genética.

Na literatura são raros os estudos de diversidade genética de *E. guineensis*, sendo esses realizados no continente de origem da espécie, a África. Maizura et al. (2006) avaliaram, utilizando o marcador molecular RFLP, 359 acessos distribuídos em 11 países africanos e observaram uma redução na variabilidade genética, sendo a Nigéria o país que se destacou positivamente apresentando elevado valor de polimorfismo (67,2%) e de alelos por loco (1,9). Nesta mesma abordagem Hayati et al. (2004) encontraram, por meio de marcadores isoenzimáticos, altos níveis de diversidade genética para as populações de Camarões, Nigéria, Serra Leoa,

Guiné, Madagascar e Senegal, que podem ser utilizadas em programas de melhoramento da espécie. Contudo, os autores verificaram baixo fluxo gênico entre as populações aumentando a possibilidade de estruturação genética.

Na Tabela 2 é abordada a comparação entre os indivíduos, conforme a distância genética de Nei (1978). Os indivíduos 5 e 6 são os mais semelhantes entre si; já a árvore 8 foi a que mais diferiu das demais apresentando os menores valores de similaridade genética com os indivíduos 2 e 5.

Construiu-se, a partir dos valores de distância genética (Nei, 1978), um dendrograma pelo método UPGMA (Figura 2), que retrata um padrão hierárquico de divergência genética.

Conforme dendrograma, os indivíduos que mais apresentaram divergência genética entre si foram o 5 e o 8, tendo o valor de distância de Nei próximo a 0,43; em seguida, foram visualizados os agrupamentos (1 e 11) e (2 e 10). As árvores mais similares foram a 6 e a 7, sendo o indivíduo 7 o caso mais extremo.

Decréscimos populacionais (gargalo genético)

Os testes de decréscimo populacional envolvem os modelos IAM e SMM, os quais fornecem a informação sobre os acontecimentos para com aquela população. Um dos modelos indicou significativamente a ocorrência de gargalo genético (bottlenecks); já o outro não. Para o modelo SMM, a população apresentou a probabilidade de $P < 0,00725$, com o número esperado de locos com excesso de heterozigidade superior ao IAM (Tabela 3).

A análise de gargalo genético indicou que a população em estudo sofreu redução de tamanho com o decorrer dos anos devido, provavelmente, às atividades agrícolas locais e à perda de habitats. De fato, observa-se que os indivíduos de *E. guineensis* tendem a se apresentar comumente em manchas populacionais, resultado da fragmentação da vegetação. Sousa (2014) verificou, em pesquisas com *Copernicia prunifera*, que a população sofreu um gargalo genético apresentando baixa diversidade na classe adulta.

Tabela 2. Identidade genética de Nei (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) entre os indivíduos de *Elaeis guineensis*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0	0,824	0,868	0,853	0,735	0,765	0,794	0,794	0,750	0,765	0,735	0,750	0,765
2	0,194	0	0,897	0,824	0,823	0,853	0,853	0,706	0,809	0,735	0,824	0,750	0,765
3	0,142	0,109	0	0,779	0,779	0,838	0,809	0,750	0,794	0,779	0,750	0,765	0,750
4	0,159	0,194	0,249	0	0,794	0,824	0,853	0,824	0,750	0,765	0,882	0,868	0,853
5	0,307	0,194	0,249	0,231	0	0,941	0,765	0,647	0,779	0,706	0,765	0,779	0,765
6	0,268	0,159	0,176	0,194	0,061	0	0,824	0,706	0,809	0,765	0,794	0,779	0,765
7	0,231	0,159	0,212	0,159	0,268	0,194	0	0,853	0,779	0,794	0,882	0,838	0,824
8	0,231	0,348	0,288	0,194	0,435	0,348	0,159	0	0,809	0,882	0,794	0,868	0,882
9	0,288	0,212	0,231	0,288	0,249	0,212	0,249	0,212	0	0,838	0,779	0,794	0,809
10	0,268	0,308	0,249	0,268	0,348	0,268	0,231	0,125	0,177	0	0,765	0,809	0,824
11	0,308	0,194	0,288	0,125	0,268	0,231	0,125	0,231	0,249	0,268	0	0,897	0,853
12	0,288	0,288	0,268	0,142	0,249	0,249	0,177	0,142	0,231	0,212	0,109	0	0,927
13	0,268	0,268	0,288	0,159	0,268	0,268	0,194	0,125	0,212	0,194	0,159	0,076	0

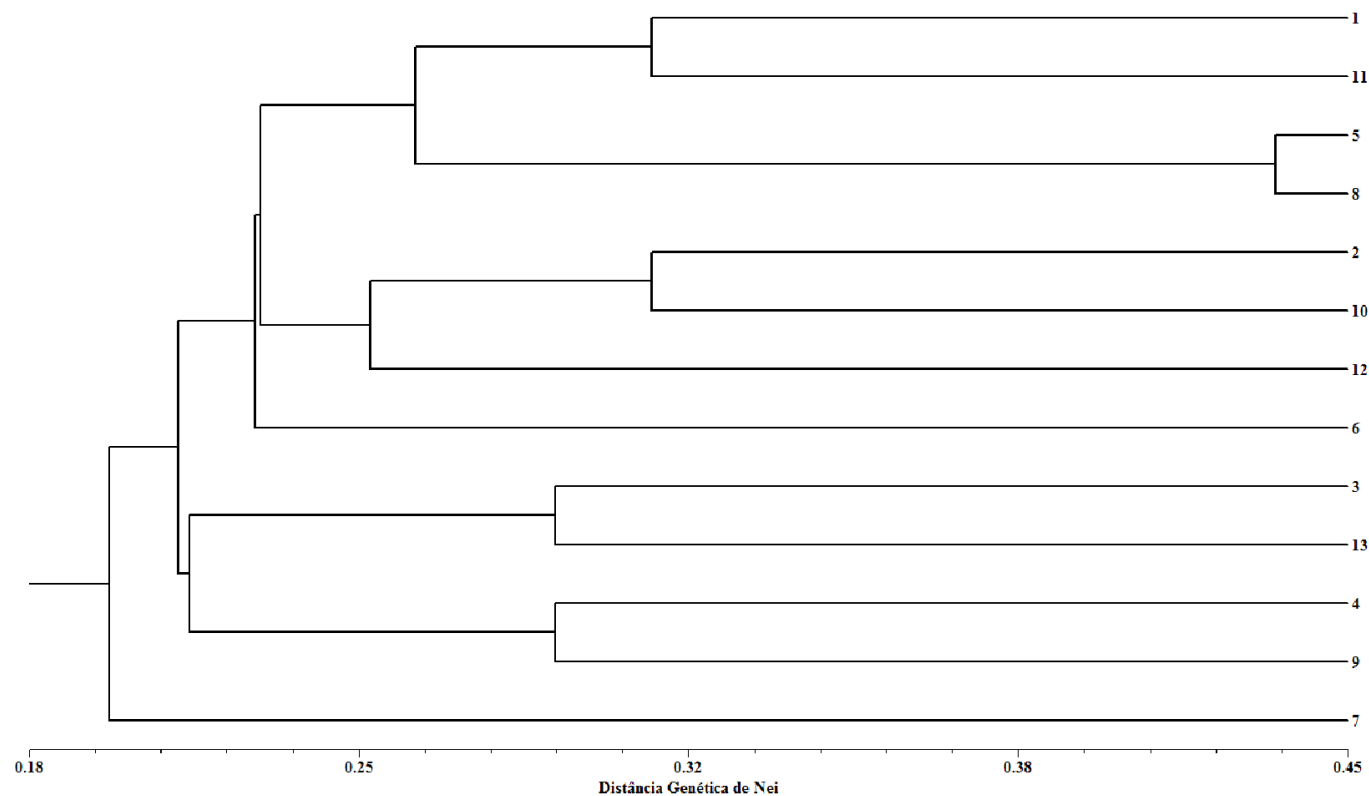


Figura 2. Dendrograma da distância genética de Nei entre os indivíduos de *Elaeis guineensis*

Tabela 3. Testes de equilíbrio entre mutação e deriva genética para a população de *Elaeis guineensis* sobre os modelos IAM e SMM

IAM			SMM		
n	Hd/He	P	n	Hd/He	P
29,97	41/27	0,2748	37,54	41/27	0,00725*

n = número esperado de locos com excesso de heteroziguidade sob o respectivo modelo; Hd/He = número de locos com déficit de heteroziguidade e excesso de heteroziguidade; P = probabilidade; * = significativo a 5% probabilidade.

Conclusão

Os marcadores ISSR utilizados para o estudo envolvendo *Elaeis guineensis* foram considerados eficientes possibilitando as análises genéticas e prováveis pesquisas de conservação da espécie. A população analisada apresentou baixa diversidade, a qual foi explicada pela análise de gargalo genético que indicou a redução populacional e genética.

Literatura Citada

- Abreu, Y. V.; Oliveira, M. A. G.; Guerra, S. M. Energia, economia e rotas tecnológicas: textos selecionados. Palmas: Eumed, 2010. 330 p.
- Brandão, M. M.; Vieira, F. A.; Carvalho, D. Estrutura genética em microescala espacial de *Myrcia splendens* (Myrtaceae). Revista Árvore, v. 35, n. 5, p.957-964. 2011. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622011000600001>>.
- Carvalho, M. Embriogênese somática a partir de folhas imaturas e flores desenvolvidas *in vitro* de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 73p. Tese Doutorado. <<http://alexandria.cpd.ufv.br:8000/teses/fitotecnia/2009/227798f.pdf>>. 20 Ago. 2014.
- Cestaro, L. A. Fragmentos de florestas atlânticas no Rio Grande do Norte: relações estruturais, florísticas e fitogeográficas. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2002. 164 p. Tese Doutorado. <http://www.bdtd.ufscar.br/htdocs/tedeSimplificado/tde_arquivos/2/TDE-2004-06-19T08:13:00Z-79/Publico/Tese_Doutorado_Luiz_Antonio_Cestaro.pdf>. 30 Ago. 2014.
- Cornuet, J. M.; Luikart, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. Genetics, v.144, p. 2001-2014, 1996. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1207747/pdf/ge14442001.pdf>>. 20 Ago. 2014.
- Denduangboripant, J.; Setaphan, S.; Suwanprasart, W.; Panha, S. Determination of local tobacco cultivars using ISSR molecular marker. Chiang Mai Journal of Science, v. 37, n. 2, p.293-303, 2010. <http://epg.science.cmu.ac.th/ejournal/dl.php?journal_id=67>.
- Doyle, J. J.; Doyle, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1987.
- Duarte, J. F. Conservação genética de *Ficus bonijesuslapensis* R. M. Castro em florestas decíduais sobre afloramentos calcários. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2011. 61p. Dissertação Mestrado. <<http://www.dcf.ufra.br/conservacao/dissertacoes/jaquelinefidelis.pdf>>. 21 Jul. 2014.
- Gonçalves, L. O.; Pinheiro, J. B.; Zucchi, M. I.; Silva-Mann, R. Caracterização genética de mulungu (*Erythrina velutina* Willd.) em áreas de baixa ocorrência. Revista de Ciência Agrônoma, v. 45, n. 2, p.290-298, 2014. <<http://dx.doi.org/10.1590/S1806-66902014000200009>>.
- Hayati, A.; Wickneswari R.; Maizura I.; Rajanaidu, N. Genetic diversity of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) germplasm collections from Africa: implications for improvement and conservation of genetic resources. Theoretical and Applied Genetics, v. 108, p. 1274-1284, 2004. <<http://dx.doi.org/10.1007/s00122-003-1545-0>>.
- Jardim, M. A. G.; Stewart, P. J. Aspectos etnobotânicos e ecológicos de palmeiras no Município de Novo Airão. Estado do Amazonas. Brasil. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Série Botânica, v. 10, n.1, p. 69-76, 1994.
- Kimura M.; Crow, J. The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics, v.49, n.4, p. 725-738, 1964. <<http://www.genetics.org/content/49/4/725.full.pdf+html>>. 28 Ago. 2014.
- Kimura M.; Otha T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, v.75, n.6, p.2868-2872, 1978. <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.75.6.2868>>.
- Maizura I.; Rajanaidu, N.; Zakri, A.H.; Cheah S.C. Assessment of genetic diversity in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Genetic Resources and Crop Evolution, v. 53, n.1, p. 187-195. 2006. <<http://dx.doi.org/10.1007/s10722-004-4004-0>>.
- Nei, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, v. 89, n.3, p.583-590, 1978. <<http://www.genetics.org/content/89/3/583.full.pdf>>. 20 Ago. 2014.
- Pádua, J. A. R. Genética da paisagem: áreas prioritárias para manejo e a conservação de *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish no Estado de Minas Gerais. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2011. 80 p. Dissertação Mestrado. <<http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/5005>>. 15 Ago. 2014.
- Rohlf, F.J. Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.1. User Guide. New York: Applied Biostatistic, 2000. 142p. <<http://www.exetersoftware.com/downloads/ntsysguide21.pdf>>. 20 Ago. 2014.
- Rolim, S. G.; Ivanauskas, N. M.; Rodrigues, R. R.; Nascimento, M. T.; Gomes, J. M. L.; Folli, D. A.; Couto, H. T. Z. Composição florística do estrato arbóreo da Floresta Estacional Semidecidual na Planície Aluvial do Rio Doce, Linhares, ES, Brasil. Acta Botanica Brasilica, v. 20, n. 3, p. 549-561, 2006. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062006000300005>>.
- 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, v. 33, n. 3, p. 868-876, 2011. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452011005000090>>.
- Silva, M.S.; Vieira, F.A.; Carvalho, D. Diversity and genetic structure in natural populations of *Geonoma schottiana* Mart (Arecaceae): implications for conservation. Cerne, v. 17, n.2, p.195-201, 2011. <<http://www.dcf.ufra.br/cerne/administracao/publicacoes/m554v17n2o6.pdf>>. 29 Ago. 2014.

- Sousa, R. F. Uso sustentável da *Copernicia prunifera* (Miller) H. E Moore no semiárido potiguar: valorização de saberes e conservação dos recursos genéticos. Macaíba: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2014. 78p. Dissertação Mestrado. <<http://repositorio.ufrn.br:8080/jspui/handle/123456789/13512>>. 20 Ago. 2014.
- Vieira, F.A.; Carvalho, D. Genetic structure of an insect-pollinated and bird-dispersed tropical tree in vegetation fragments and corridors: implications for conservation. *Biodiversity and Conservation*, v. 17, n.2, p. 2305-2321, 2008. <<http://dx.doi.org/10.1007/s10531-008-9367-7>>.
- Wahid, B. M.; Abdullah, S. N. A; Henson, I. E. Oil palm: achievements and potential. *Plant Production Science*, v.8, n.3, p.288-297, 2005. <https://www.jstage.jst.go.jp/article/pps/8/3/8_3_288/_pdf>. 02 Ago. 2014.
- Yeh, F. C.; Yang, R. C.; Boyle, T. B. J.; Ye, Z. H.; Mao, J. X. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Edmonton: Molecular Biology and Biotechnology Center; University of Alberta, 1997.
- Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, v.20, n.2, p.176-183, 1994. <<http://dx.doi.org/10.1006/geno.1994.1151>>.