

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE PROGÊNIES DE GRAVIOLEIRA

Eveline Nogueira Lima¹, Maria Emília Bezerra de Araújo², Joilson Silva Lima³,
Ingrid Bernardo de Lima⁴, Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini⁵

¹Doutoranda em Agronomia/Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil. E-mail: evelinenlima@gmail.com

² Mestranda em Agronomia/ Engenharia Agrícola, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil

³Doutorando em Agronomia/Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil

⁴Doutoranda em Agronomia/Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil

⁵Doutora em Melhoramento Vegetal/ Professora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil

Recebido em: 30/09/2014 – Aprovado em: 15/11/2014 – Publicado em: 01/12/2014

RESUMO

Diversos problemas fitotécnicos, especialmente fitossanitários, que ocorrem na gravioleira (*Annona muricata* L.) fazem com que a grande maioria dos projetos de exploração desta cultura no Nordeste brasileiro sejam frustrados quanto ao desempenho vegetativo e produtivo. Logo, faz-se necessário o conhecimento da base genética para a seleção de genótipos superiores, e assim poderem-se obter ganhos genéticos para características de importância econômica. Neste sentido, objetivou-se caracterizar e avaliar a variabilidade genética de progênies de gravioleira por meio de marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Foram utilizadas 25 progênies de gravioleira provenientes de pomares domésticos, cultivadas no Campo Experimental do Curu, pertencente à Embrapa Agroindústria Tropical, localizado em Paraipaba-CE. Durante a emissão de folhas novas foi coletado material vegetal para a extração e amplificação do DNA. Os marcadores ISSR utilizados apresentaram polimorfismo e foram eficientes para caracterizar e diferenciar as progênies, as quais evidenciaram variabilidade genética. Estas informações devem ser utilizadas em futuros trabalhos de melhoramento genético visando desenvolver combinações híbridas superiores.

PALAVRAS-CHAVE: *Annona muricata* L., diversidade, marcadores ISSR.

GENETIC VARIABILITY ANALYSIS OF SOURSOP PROGENIES

ABSTRACT

Several phytotechnical problems occur in soursop (*Annona muricata* L.). So, the vast majority of exploration projects of this culture in Brazil Northeast are extensive frustrated about the vegetative and productive performance. Therefore, it is necessitates the knowledge of the genetic basis for the selection of superior genotypes, and thus can-get genetic gain for traits of economic importance. In this sense, it was aimed to characterize and evaluate the genetic variability of soursop progeny by molecular markers ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Were used 25 progenies from soursop orchards, grown in the Campo Experimental do Curu, belonging to Embrapa Agroindustria Tropical, in Paraipaba,

Ceará States. During the emission of new leaves, it was collected plant material for extraction and amplification of DNA. The ISSR primers showed polymorphism and were used to characterize and differentiate efficient progenies, which showed genetic variability used. This information should be used in future breeding programs aimed at developing superior hybrids.

KEYWORDS: *Annona muricata* L., diversity, ISSR markers.

INTRODUÇÃO

A gravioleira (*Annona muricata* L.) é uma frutífera da família Annonaceae. Essa espécie é bastante difundida em países subtropicais e tropicais e, encontra na região do Nordeste brasileiro condições edafoclimáticas compatíveis com suas exigências nutricionais e fisiológicas (BARBOSA et al., 2003).

De acordo com SACRAMENTO et al. (2003), em algumas regiões do Nordeste brasileiro a colheita de graviola ocorre durante todo o ano, com picos de produção em alguns meses. Na região Sul da Bahia a produção ocorre durante o ano todo, com maior concentração entre outubro e fevereiro e no mês de junho, sendo que a produtividade varia de 5 a 20 t/ha/ano.

A comercialização da graviola se destaca por apresentar excelente rentabilidade, boa aceitação e uma oferta escassa. A demanda do fruto, tanto no mercado interno quanto no externo, tem motivado os produtores, principalmente do Nordeste brasileiro, a promoverem o cultivo racional da gravioleira (ELOI et al., 2007).

Estudos sobre a variabilidade genética da espécie são relevantes, pois restrições no fluxo gênico entre populações têm papel importante na evolução da adaptação local, contemplando o desenvolvimento de resistência a inseticidas e estabelecimento de raças hospedeiras (GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2002). Visando um efetivo controle de pragas e doenças para essa cultura, fez-se necessário o entendimento sobre a variação genética dentro e entre populações dessa frutífera. Dessa forma, para aumentar a lucratividade do setor produtivo e evitar ameaças de viabilidade deste agronegócio várias pesquisas foram desenvolvidas para a obtenção de novos cultivares visando o aumento da produtividade, melhoria da qualidade da polpa para o uso industrial e para o consumo *in natura*. Neste sentido, a caracterização da gravioleira através da utilização de marcadores moleculares torna-se imprescindível, não só para a sua identificação genética, mas, principalmente, para avaliar a divergência genética entre genótipos de interesse.

Segundo CRESTE (2003), o desenvolvimento e a aplicação de tecnologias baseadas em marcadores moleculares fornecem ferramentas únicas, capazes de revelar o polimorfismo em nível de sequências de DNA, suficientes para discriminar a variação genética entre os indivíduos e dentro de populações. Os marcadores moleculares têm sido sugeridos como ferramentas úteis no melhoramento de plantas em varias situações. São utilizados com sucesso na definição de grupos heteróticos em varias espécies vegetais, na caracterização de acessos de germoplasma e nos retrocruzamentos, auxiliando na seleção para o genitor recorrente e aumentando a eficiência do processo (RUMIN, 2005). Dentre os marcadores existentes, o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) tem sido muito utilizado para caracterização e avaliação da variabilidade genética em diversas culturas (GRATTAPAGLIA, 2001). Segundo este autor, esse marcador é considerado ideal para a compreensão de padrões de fluxo gênico e parentesco, além de permitir uma amostragem extensiva do genoma de interesse com relação ao DNA, sem influência do ambiente, e

gerando uma grande quantidade de caracteres adicionais.

Objetivou-se nesse trabalho avaliar a variabilidade genética entre 25 progênies de gravioleira utilizando marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*).

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e extração de DNA

Para realização desse trabalho foram utilizadas 25 progênies de gravioleira (Quadro 1), das variedades, Lisa, Blanca, Morada, FAO I e II e Crioulas locais, plantadas em maio/2003, no Campo Experimental do Curu, pertencente à Embrapa Agroindústria Tropical, localizado no município de Paraipaba, estado do Ceará. As plantas constituintes de cada progênie foram obtidas por meio de seleção fenotípica de plantas superiores, formadas a partir da propagação sexuada, oriundas de pomares domésticos e cultivos comerciais localizados nos estados do Ceará e Piauí.

QUADRO 1. Identificação, origem das 25 progênies, nome dos acessos e local de destino das gravioleiras avaliados por meio de marcadores ISSR.

Identificação	Origem	Nome do acesso	Local
1	M1	MORADA	PACAJUS
2	M2	MORADA	PACAJUS
3	P1	SELEÇÃO EXPERIMENTO CLODÍON	PACAJUS
4	AB1	MISTURA DE A E B	PACAJUS
5	AB2	MISTURA DE A E B	PACAJUS
6	L1	LISA	PACAJUS
7	L2	LISA	PACAJUS
8	C1	CRIOULA	PACAJUS
9	C2	CRIOULA	PIO IX
10	C3	CRIOULA	PACAJUS EXP 99
11	C4	CRIOULA	PACAJUS
12	PR48	SELEÇÃO EXPERIMENTO CLODÍON	PARAIPABA
13	PR102	SELEÇÃO EXPERIMENTO CLODÍON	PARAIPABA
14	PR172	SELEÇÃO EXPERIMENTO CLODÍON	PARAIPABA
15	PR148	SELEÇÃO EXPERIMENTO. CLODÍON	PARAIPABA
16	PR103	SELEÇÃO EXPERIMENTO CLODÍON	PARAIPABA
17	PR49	SELEÇÃO EXPERIMENTO CLODÍON	PARAIPABA
18	PR318	SELEÇÃO EXPERIMENTO CLODÍON	PARAIPABA
19	CLO23	CLONES	PARAIPABA
20	CLO87	CLONES	PARAIPABA
21	CLO150	CLONES	PARAIPABA
22	C6	CRIOULA	MARCO, CE
23	C7	CRIOULA	QUIXERÉ, CE
24	C8	CRIOULA	ICÓ, CE
25	C9	CRIOULA	BARAÚNAS, RN

Amostras constituídas de cinco folhas jovens de cada uma das cinco repetições de cada progênie foram coletadas e levadas ao laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, Ceará. As extrações de DNA foram efetuadas usando o protocolo de CAVALCANTI & WILKINSON (2007) com modificações (tempo no banho-maria para 3 minutos e número de lavagens com clorofórmio/ álcool isoamil para duas lavagens). Após as extrações, a qualidade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose 1% e a quantificação foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop 2000. Depois da quantificação da concentração de ácidos nucleicos extraídos, as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ e armazenadas em freezer a $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Análise ISSR e análise dos dados

Foram realizados testes preliminares de amplificação com 49 iniciadores ISSR, utilizando quatro genótipos selecionados ao acaso. Desses, 30 iniciadores apresentaram os melhores resultados quanto à amplificação em termos de quantidade e nitidez de bandas amplificadas. A partir dos resultados iniciais obtidos, esses iniciadores foram selecionados para a realização da caracterização das 25 progênies de gravioleira.

As condições de reação foram testadas de forma a otimizar as amplificações para cada um dos 30 iniciadores anteriormente escolhidos. Foram testados vários componentes de PCR: diferentes concentrações de MgCl_2 (1,0 mM, 1,5 mM ou 2,0 mM), presença e ausência de BSA (10 μg) e diferentes marcas de Taq DNA Polimerase (DNA Polimerase ou DNA Polimerase Platinum). Os padrões de fragmentos que cada iniciador produziu em cada combinação de fatores foram avaliados visualmente, tendo-se observado a reprodutibilidade e a intensidade dos fragmentos e a presença de polimorfismo. Finalmente, foram escolhidos 20 iniciadores entre os 30 testados.

As reações de amplificação foram conduzidas considerando o volume final de 25 μl , composto por: 2,5 μl de tampão de reação 10x, 1,0 μl de MgCl_2 50 mM, 0,2 μl de dNTPs (10 mM nucleotídeo⁻¹), 2,0 μl de DNA (5 ng μl^{-1}), 2 μl de cada iniciador (10 μM), 1 μl de BSA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 0,2 μl de Taq DNA polimerase platinum®-marca Invitrogen. As condições de PCR utilizadas foram: 5 minutos a $94 \text{ }^\circ\text{C}$ (desnaturação inicial), seguindo-se de 40 ciclos de desnaturação ($94 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 minuto), anelamento ($47\text{-}55 \text{ }^\circ\text{C}$, dependendo das características de cada iniciador, por 1 minuto) e extensão ($72 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 minuto) seguindo-se de uma etapa de extensão final ($72 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 minutos). As reações de amplificação foram realizadas em dois termocicladores, sendo um do modelo TC 512® e o outro FLEXIGENE®, ambos da TECHNE.

As reações foram preparadas isoladamente e os produtos da amplificação (bandas) foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1,8% em TBE (90 mM Tris-ácido bórico/1 mM EDTA), corado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e submetidos a 90 volts por aproximadamente 3 horas. Posteriormente os géis foram visualizados sob luz UV e fotografados em fotodocumentador digital Canon PowerShot A620

Com base nos padrões de amplificação obtidos, foi construída uma matriz de similaridade genética aplicando o coeficiente de Jaccard (J), calculado de acordo com a fórmula: $IAB = A / (A+B+C)$, em que A corresponde a presença da mesma banda em ambos os indivíduos, B é decorrente da presença da banda no indivíduo 1 e ausência no indivíduo 2, e C corresponde a ausência da banda no indivíduo 1 e

presença no indivíduo 2. A partir dessa matriz, o método de agrupamento utilizado para a obtenção do dendrograma foi o método UPGMA (Método de média aritmética não ponderada). Para as análises estatísticas foi utilizado o programa computacional STATSOFT INC (TURSAL, 1999).

Para a verificação do ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma, foi calculado o coeficiente de correlação cofenética (r), conforme SOKAL & ROHLF (1962). As análises foram realizadas com auxílio do programa computacional NTSYS pc 2.1 (ROHLF, 2000)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As condições selecionadas após a etapa de otimização dos iniciadores foram de 2,0 mM de MgCl₂, adição de BSA (10 (g (l-1) e Taq DNA Polimerase Platinum. A análise dos dados com os 20 iniciadores selecionados revelou variação no número de fragmentos amplificados, totalizando 149 fragmentos de DNA amplificados, sendo 85 fragmentos polimórficos (Quadro 2).

QUADRO 2. Sequência do iniciador, bandas geradas (BG), bandas polimórficas (BP) e tamanhos das bandas em pares de bases (TPB) dos 20 iniciadores ISSR utilizadas na caracterização das progênes de gravioleira.

Iniciador	Sequência (5' → 3')	BG	BP	TPB
878	AGA GAG AGA GAG AGA GC	7	3	300-1000
822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	8	5	500-1500
826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	15	11	500-1500
886	CAC ACA CAC ACA CAC AT	10	5	200-1500
811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	10	7	300-1000
846	CAC ACA CAC ACA CAC ART	8	5	500-1500
847	CAC ACA CAC ACA CAC AA	9	6	300-2000
885	ACA CAC ACA CAC ACA CG	9	3	200-900
851	GAG AGA GAG AGA GAG AA	7	4	600-1500
812	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	8	3	200-1600
825	5' ACA CAC ACA CAC ACA CT	8	4	300-1500
849	5' GTG TGT GTG TGT GTG TYA	10	7	200-1600
834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	9	3	400-2000
818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	10	7	300-1500
835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	9	3	200-2000
848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG	8	3	200-1000
821	GTG TGT GTG TGT GTG TT	6	3	1000-1600
824	TCT CTC TCT CTC TCT CG	5	3	400-1500
803	ATA TAT ATA TAT ATA TC	8	5	400-1500
884	HBH AGA GAG AGA GAG GA	4	3	300-1500
TOTAL		149	85	

B: G,T; H: A, C, T; Y: C,T.

O número de bandas polimórficas por iniciador variou de três (I 812, I 821, I 824, I 834, I 835, I 848, I 878, I 884 e I 885) a onze (iniciador I 826). Os fragmentos que apresentaram coloração fraca e baixa resolução não foram considerados na análise de dados. Na Figura 1 encontra-se o padrão de amplificação obtido a partir do iniciador de código I 812.

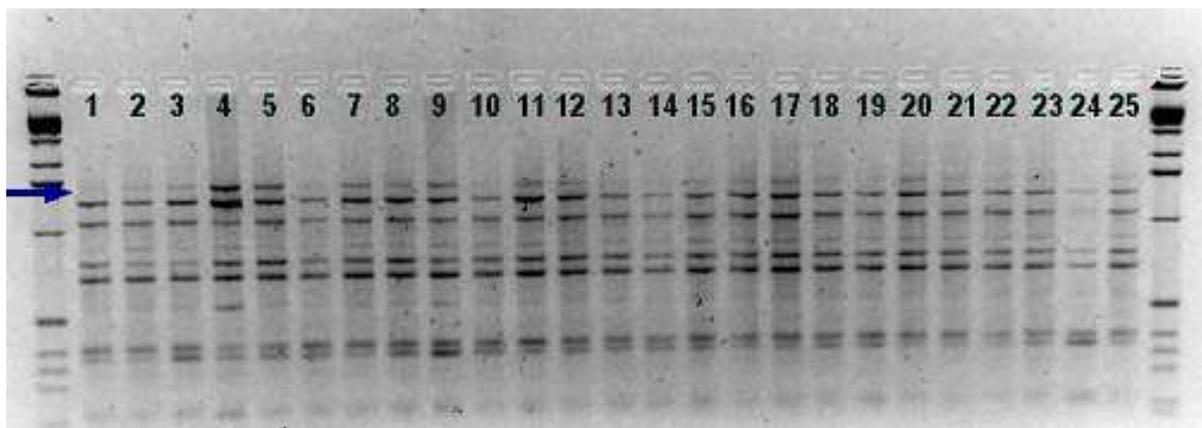


FIGURA 1. Padrão de amplificação de 25 progênies de gravioleira utilizando o iniciador I 812. Colunas-laterais marcador de 1kb e colunas de 1 a 25 correspondem aos genótipos de gravioleira. Seta indica marcador polimórfico.

SANTANA (2011) estudando a variabilidade genética entre 17 acessos de umbu-cajazeira através de 25 iniciadores ISSR obteve 249 fragmentos amplificados, dos quais 80% foram polimórficos. Nesta avaliação, o autor constatou um padrão de amplificação com grande número de bandas, sendo que o número de fragmentos por iniciador variou entre 5 e 16, o que é uma característica comum dos marcadores ISSR.

A partir do polimorfismo identificado foi possível determinar a matriz de distâncias entre os acessos. Desta, construiu-se o dendrograma (Figura 2) que apresentou uma correlação cofenética (r_c) de 0,86, um valor considerado alto quando comparado com o mínimo de 0,6 sugerido por MANLY (1997). Valores acima de $r=0,70$ são os ideais, pois significa que existe uma forte relação entre os valores na matriz de distâncias e a representação no dendrograma.

A média de dissimilaridade encontrada entre os genótipos de gravioleira avaliados foi de 72% (Figura 2), demonstrando elevada variabilidade genética, a qual poderá ser explorada em trabalhos de melhoramento.

A análise de agrupamento realizada com base nas distâncias genéticas permitiu dividir as 25 progênies de gravioleira em dois grupos principais de progênies de gravioleira (GA e GB) e estes foram divididos em seis subgrupos de similaridade genética (Quadro 3), para a escolha do ponto de corte, no dendrograma foi utilizada a média da matriz de distâncias genéticas.

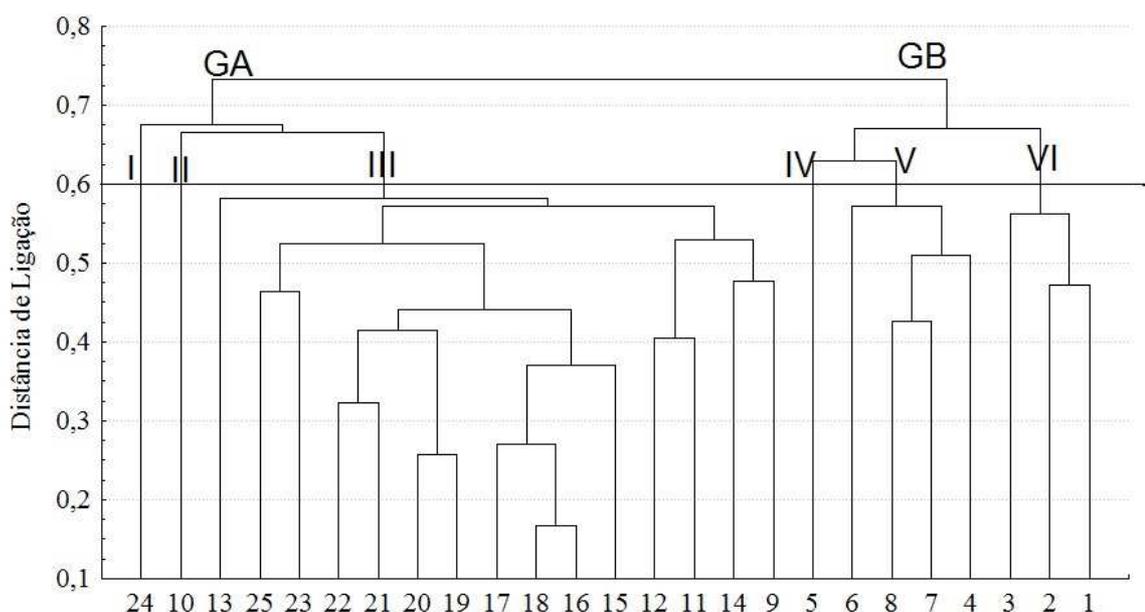


FIGURA 2. Dendrograma obtido a partir da amplificação de fragmentos de DNA utilizando 20 marcadores ISSR na avaliação de 25 progênies de gravioleira. Grupos formados GA e GB, de I a VI subgrupos formados.

ALMEIDA et al. (2008), trabalhando com 14 cultivares de cana-de-açúcar avaliadas com a utilização de oito iniciadores ISSR verificaram a formação de seis grupos distintos. SANTANA et al. (2011), estimando a variabilidade de acessos de umbu-cajeira através do uso de 25 iniciadores ISSR verificaram o agrupamento de 17 acessos em cinco grupos principais. Esses resultados demonstram a eficiência dos marcadores ISSR na detecção do polimorfismo genético. Os marcadores ISSR possuem a vantagem de gerar grandes quantidades de bandas, sendo abundantes ao longo do genoma de eucariontes, assim são bastante úteis na avaliação de populações em estudos genéticos, na detecção da diversidade genética e em estudos de mapeamento genético (ESSELMAN et al., 1999).

QUADRO 3. Grupos e subgrupos obtidos a partir da amplificação de fragmentos de DNA utilizando 20 iniciadores ISSR na avaliação de 25 progênies de gravioleira.

Grupo	Subgrupos	Progênies
GRUPO A	SUBGRUPO I	24
	SUBGRUPO II	10
	SUBGRUPO III	13, 25, 23, 22, 21, 20, 19, 17, 18, 16, 15, 12, 11, 14, 9.
GRUPO B	SUBGRUPO IV	5
	SUBGRUPO V	6, 8, 7, 4
	SUBGRUPO VI	3, 2, 1

O primeiro grupo foi formado por 17 progênies, e foi subdividido em três subgrupos, sendo o subgrupo I formado pela progênie 24, o subgrupo II formado pela progênie 10 e o subgrupo III constituído pelas demais 15 progênies (13, 25, 23, 22, 21, 20, 19, 17, 18, 16, 15, 12, 11, 14 e 9). O segundo grupo foi subdividido em três subgrupos, sendo subgrupo IV formado pela progênie 5, o subgrupo V constituído

pelas progênies 6, 8, 7 e 4, e o subgrupo VI formado pelas progênies 1, 2 e 3.

Segundo FONSECA et al. (2006), a elevada variabilidade genética possibilita a identificação de genótipos divergentes e, por conseguinte, a sugestão de combinações híbridas de maior efeito heterótico, permitindo em suas gerações segregantes o desenvolvimento de genótipos superiores. Devendo-se, portanto, na seleção de genitores para cruzamentos, procurar sempre aliar o bom desempenho fenotípico dos genótipos com a divergência genética.

Os Marcadores ISSR, devido seu alto mecanismo de reconhecimento de variações inter e intraespecíficas, tem sido bastante utilizados em trabalhos de melhoramento de plantas. A divergência genética entre genitores pode promover combinações gênicas favoráveis, mediante efeitos de aditividade, pleiotropia e epistasia (CHIORATO, 2004).

O fato de a gravioleira ser uma frutífera ainda em domesticação justifica a elevada diversidade genética encontrada entre os genótipos. Esta divergência tão acentuada é interessante em trabalhos de melhoramento de plantas de crescimento indeterminado, pois permite a permuta de genes responsáveis pela expressão de diferentes caracteres.

CONCLUSÕES

As progênies 24 e 10 são as mais divergentes, há significativa variabilidade genética entre as progênies de gravioleira avaliadas e a metodologia de marcadores ISSR é uma ferramenta útil e eficiente para análises moleculares de gravioleira.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C.M.A.; LIMA, S.E.N.; LIMA, G.S. A.; BRITO, J.Z.; DONATO, V.M.T.S.; SILVA, M. V.; Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. **Ciência Agrotecnologia**. v. 3, p.1771-1776, 2009.

BARBOSA, Z; SOARES, I; CRISÓSTOMO, L.A. Crescimento e absorção de nutrientes por mudas de gravioleira. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 25, p.519-522, 2003.

CAVALCANTI, J.J.V.; WILKINSON, M.J. The first genetic maps of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Euphytica** (Wageningen), v.157, p.131-143, 2007.

CHIORATO, A.F.; CARBONELL, S.A.M.; COLOMBO, C.A.; DIAS, L.A. S; ITO, M.F. Genetic diversity of common bean accessions in the germplasm bank of the Instituto Agrônômico - IAC. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v.5, p.1-9, 2005.

CRESTE, S.; TULMANN, N.A.; SILVA, S.O.; FIGUEIRA, A. Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers. **Euphytica** (Wageningen). v.132, p.259-268, 2003.

ELOI, W.M.; VIANA, T.V A.; SOUSA, V.F; ANDRADE JÚNIOR. A.S.; AZEVEDO, B.M.. Efeitos da fertirrigação de N e K₂O na distribuição do sistema radicular da gravioleira. **Revista Caatinga**, v.20, p.50-58, 2007.

ESSELMAN, E.J.; JIANQIANG, L.; CRAWFORD, D.J.; WINDUSS, J.L.; WOLFE, A.D. Clonal diversity in the rare *Calamagrotis porter* ssp. *Inesperata* (Poaceae): Comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD)

and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**. v.8, p.443-451,1999.

FONSECA, A.F.A.; SEDIYAMA, T.; CRUZ, C.D.; SAKAYAMA, N.S.; FERRÃO, M.A.G.; BRAGANÇA, S.M. Divergência genética em café conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.4, p.599-605, 2006.

GRATTAPAGLIA, D. Marcadores moleculares em espécies florestais *Eucaliptus* como modelo. **Recursos genéticos e melhoramento: plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, p. 967-1010 2001.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A.; BENREY, B.; CALLEJAS, A.; OYAMA, K. Inter and intraspecific genetic variation and differentiation in the sibling bean weevils *Zabrotes subfasciatus* and *Z. sylvestris* (*Coleoptera: Bruchidae*) from Mexico. **Bulletin of Entomological Research**, v.92, p.185-189, 2002.

MANLY B.F.J.; **Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology**. Chapman e Hall, London, 1997. 281p.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1**. Exeter Software, New York, 2000. 98p.

RUMIN, G.C.R.; VENCOVSKY, R. Índice baseado em RFLPs para seleção de linhagens visando sintéticos de milho. **Scientia Agricola**. v. 58, p.303-311, 2001.

SACRAMENTO, C.K.; FARIA. J.C.; CRUZ. F.L.da; BARRETTO. W.S.; GASPAR. J.W.; LEITE. J.B.V. Caracterização física e química de frutos de três tipos de gravioleira (*Annona muricata* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 25, p.329-331, 2003.

SANTANA, I.B.B.; OLIVEIRA, E.J.; FILHO, W.S.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, p.868-876, 2011.

STATSOFT INC. **Statistica for Windows [Computer program manual]** Tulsa, OK. StatSoft Inc. 2300 East 14th Street, Tulsa. 1999.