



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/FITOTECNIA**

**NATHÁLIA DIAS DE OLIVEIRA AMARAL**

**ESTIMATIVAS DA TAXA DE CRUZAMENTO EM PROGÊNIES MEIO-  
IRMÃS DE CAJUEIRO ANÃO PRECOCE UTILIZANDO MARCADORES  
MOLECULARES**

**FORTALEZA**

**2010**

**NATHÁLIA DIAS DE OLIVEIRA AMARAL**

**ESTIMATIVAS DA TAXA DE CRUZAMENTO EM PROGÊNIES MEIO-  
IRMÃS DE CAJUEIRO ANÃO PRECOCE UTILIZANDO MARCADORES  
MOLECULARES**

Dissertação submetida à coordenação do Curso de pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Fitotecnia.

Área de concentração: Melhoramento de Plantas.

Orientador: Prof. Ph.D., José Jaime Vasconcelos Cavalcanti.

**FORTALEZA**

**2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

A515e Amaral, Nathália Dias de Oliveira.

Estimativas da taxa de cruzamento em progênies meio-irmãs de cajueiro anão precoce utilizando marcadores moleculares / Nathália Dias de Oliveira Amaral. – 2010.  
66 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2010.

Orientação: Prof. Dr. José Jaime Vasconcelos Cavalcanti.  
Coorientação: Profa. Dra. Gláucia Salles Cortopassi Buso.

1. Anacardium occidentale L.. 2. SSR. 3. Sistema de reprodução. I. Título.

CDD 630

---

**NATHÁLIA DIAS DE OLIVEIRA AMARAL**

**ESTIMATIVAS DA TAXA DE CRUZAMENTO EM PROGÊNIES MEIO-IRMÃS  
DE CAJUEIRO ANÃO PRECOCE UTILIZANDO MARCADORES  
MOLECULARES**

Dissertação submetida à coordenação do Curso de pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia Área de concentração Melhoramento de Plantas.

APROVADA em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---


Ph.D., José Jaime Vasconcelos Cavalcanti (Orientador)  
Pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical

---

Dra., Gláucia Salles Cortopassi Buso (Co-orientadora)  
Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

---

Dra., Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini  
Professora da Universidade Federal do Ceará



Aos meus pais José Waldemar de Oliveira Filho e Lúcia Maria Magalhães Dias, aos meus irmãos Olívia, Thiago, Samuel e Sara, ao meu querido e amado esposo, Fabio Teixeira do Amaral e ao nosso querido e já muito amado bebê, Victor. Obrigada por encorajar, compreender os momentos difíceis e acreditar na minha vitória.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Deus por está sempre presente na minha vida e por ter permitido mais essa vitória;

À Universidade Federal do Ceará por disponibilizar o curso pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia;

À EMBRAPA Agroindústria Tropical por ceder todo o material, instalações e equipamentos necessários à realização deste trabalho;

Ao Doutor José Jaime Vasconcelos Cavalcanti, pelo incentivo, apoio, paciência e pelos grandes ensinamentos transmitidos;

À Pesquisadora Gláucia Salles Cortopassi Buso pela oportunidade de aprendizagem no Laboratório de Genética Vegetal na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a oportunidade de participar da banca examinadora.

À professora Cândida Bertini, pelo incentivo, apoio, amizade e por ter contribuído de forma tão singular na minha vida acadêmica, através de seus ensinamentos e sugestões;

À doutora Patrícia do Nascimento Bordallo, sempre disponível e atenciosa;

Ao pesquisador Fernando Aragão pela disposição e auxílio;

Ao pesquisador, Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho pela disposição e auxílio na etapa final desse trabalho;

A todos os professores do curso pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, que contribuíram para a minha formação acadêmica;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro;

À aluna de mestrado da UnB, Natalia da Silva e Lamas pela grande ajuda e amizade no período que passei em Brasília e por ter concedido seus primers para meu trabalho;

À toda a equipe do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agroindústria Tropical pelo convívio e amizade;

A todos os colegas da Agronomia e do curso de pós-graduação por todas as experiências vividas, a união, a solidariedade e ajuda mútua. Em especial aos meus

amigos Francisco Thiago, Hayna, Glauber, Gustavo, Ravena, Afrânio, Aline, Maria, Kelly, pela grande amizade que surgiu.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para o sucesso não só deste trabalho, mas que de alguma forma influenciaram e fizeram parte de minha vida, meu eterno e sincero obrigado!!!

## RESUMO

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma planta arbórea perene, atualmente cultivada em diversos países da faixa intertropical terrestre. Esta é uma fruteira de grande relevância para o Brasil, pois destaca-se no contexto sócio-econômico, pelo valor nutritivo e comercial de seus produtos. Apesar da sua importância, a cajucultura vem mostrando diversos problemas, apresentando decréscimo na produtividade dos pomares. Desta forma, programas de melhoramento genético do cajueiro da Embrapa Agroindústria Tropical buscam ampliar os ganhos genéticos para as características de importância econômica. Mas para isso é necessário conhecer e avaliar a base genética disponível para potencializar a seleção dos genótipos superiores. O sistema de reprodução é utilizado em programas de melhoramento, pois permite delinear melhores estratégias de amostragem da variabilidade e selecionar modelos mais adequados para estimar os parâmetros de interesse. O objetivo deste trabalho foi obter informações sobre o sistema de reprodução de seis famílias de cajueiros pertencentes ao programa de melhoramento da Embrapa Agroindústria Tropical localizado em Pacajus – CE utilizando Marcadores microssatélites (SSR). Foram amostradas 24 progênies de polinização aberta para cada uma das 6 famílias utilizando-se 6 marcadores SSR (AOBR1, AOBR3, AOBR6, AOBR9, AOBR15 e AOBR18). A partir dos marcadores SSR foi possível identificar 16 alelos para as famílias avaliadas, estes variaram de 2 a 3 alelos por locos, com uma média de 2,66 alelos. Os parâmetros das taxas de cruzamento foram estimados com o programa MLTR pelo modelo misto de cruzamento. Nas famílias, as estimativas da taxa de cruzamento multilocos ( $t_m$ ) obtidas pelo método EM variaram de 0,193 (0,016) a 0,980 (0,017). As estimativas obtidas foram:  $t_m$  para a população foi de 0,518 (0,133), a taxa unilocos ( $t_{smédio}$ ) foi de 0,464 (0,138), a taxa de cruzamento entre aparentados ( $t_m - t_s$ ) foi de 0,054 (0,023) e taxa de autofecundação ( $s$ ) foi de 0,482, indicando que a espécie é de reprodução mista. Com os resultados obtidos, conclui-se que o cajueiro tende a alogamia e que a taxa de cruzamento varia entre famílias, fato que deve ser levado em consideração em programas de melhoramento e conservação de germoplasma.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale* L., SSR, Sistema de Reprodução



## ABSTRACT

The cashew tree (*Anacardium occidentale* L.) is a perennial tree species currently cultivated in various countries within the terrestrial intertropical belt. This fruit tree is of great relevance to Brazil, as it stands out in the socio-economic context due to the nutritional and commercial value of its products. Despite its importance, cashew cultivation has faced several challenges, leading to a decline in orchard productivity. Consequently, the genetic improvement programs for cashew trees at Embrapa Agroindústria Tropical aim to enhance genetic gains in economically important traits. However, to achieve this, it is necessary to understand and evaluate the available genetic base to optimize the selection of superior genotypes. The reproduction system is employed in breeding programs as it allows for the design of better variability sampling strategies and the selection of more appropriate models for estimating the parameters of interest. The objective of this study was to obtain information about the reproduction system of six cashew tree families belonging to the Embrapa Agroindústria Tropical breeding program located in Pacajus – CE using microsatellite markers (SSR). A total of 24 open-pollinated progenies were sampled for each of the six families using six SSR markers (AOBR1, AOBR3, AOBR6, AOBR9, AOBR15, and AOBR18). The SSR markers enabled the identification of 16 alleles in the evaluated families, which varied from 2 to 3 alleles per locus, with an average of 2.66 alleles. The crossing rate parameters were estimated using the MLTR program through the mixed mating model. Within families, estimates of the multilocus outcrossing rate ( $t_m$ ), obtained by the EM method, ranged from 0.193 (0.016) to 0.980 (0.017). The estimates obtained were as follows: the  $t_m$  for the population was 0.518 (0.133), the single-locus rate ( $t_s$ ) was 0.464 (0.138), the crossing rate among relatives ( $t_m - t_s$ ) was 0.054 (0.023), and the selfing rate ( $s$ ) was 0.482, indicating that the species exhibits a mixed reproductive system. Based on the results obtained, it is concluded that the cashew tree tends towards allogamy and that the crossing rate varies among families, a factor that should be considered in germplasm improvement and conservation programs.

**Keywords:** *Anacardium occidentale* L., SSR, Reproduction System

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais características dos cajueiros dos tipos comum e anão precoce ....	22
<b>Tabela 2.</b> Identificação dos materiais utilizados no experimento. ....	40
<b>Tabela 3.</b> Primers de marcadores microssatélites de <i>Anacardium occidentale</i> utilizados no experimento .....	41
<b>Tabela 4.</b> Primers de microssatélites (SSR), quantidade de alelos por primers e tamanho dos alelos por pares de base. Dados obtidos a partir da amplificação do DNA das 6 famílias com a utilização dos 6 primers SSR. Estes resultados foram visualizados utilizando o sistema de gel desnaturante de poliacrilamida corado com nitrato de prata.....	47
<b>Tabela 5.</b> Frequências alélicas e tamanho das amostras (n) para cada um dos seis locos SSR de seis famílias de progênies meio-irmãs de cajueiro anão precoce .....	48
<b>Tabela 6.</b> Estimativas de máxima verossimilhança da taxa de cruzamento do cajueiro com base em multilocos ( $t_m$ ) em nível de população e de família, e uniloco média ( $t_{smédia}$ ) obtidas pelo método auxiliar de maximização da esperança.....	50
<b>Tabela 7.</b> Resultados dos alelos das progênies maternas e os valores da taxa de cruzamento de suas respectivas progênies (t).....	52
<b>Tabela 8.</b> Planilhas com os dados obtidos a partir da amplificação do DNA das 6 famílias com a utilização dos 6 primers SSR. Estes resultados foram visualizados utilizando o sistema de gel desnaturante de poliacrilamida corado com nitrato de prata.....	61

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – 1. Inflorescências, 2. frutos jovens e 3. 4. 5. pseudofrutos. ....	19
<b>Figura 2</b> – Fotografia de um cajueiro do tipo comum .....	20
<b>Figura 3</b> – Campo com cajueiros do tipo anão precoce.....	21
<b>Figura 4</b> - Produtos derivados do caju. ....	22
<b>Figura 5</b> - Exemplo do vigor de híbrido (heterose) e da depressão por endogamia no cajueiro. Pacajús, CE. ....	27
<b>Figura 6</b> - Ensaio de Progênies de cajueiro anão precoce .....	39

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL .....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	Cajueiro.....	15
2.1.1	Classificação Botânica.....	15
2.1.2	Origem e Diversidade.....	16
2.1.3	Aspectos Morfológicos e Reprodutivos .....	18
2.1.4	Variabilidade .....	19
2.1.5	Importância sócio-econômica.....	22
2.2	Melhoramento Genético do Cajueiro.....	23
2.2.1	Histórico .....	23
2.2.2	Propriedades Genéticas.....	25
2.3	Marcadores Moleculares.....	29
	Marcadores Microsatélites .....	34
2.4	Taxa de Cruzamento .....	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1	Material Utilizado .....	38
3.2	Extração de DNA.....	40
3.3	Amplificação do DNA .....	41
3.4	Resolução e Visualização dos Fragmentos Amplificados .....	42
3.5	Análise dos Dados.....	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	46
5	CONCLUSÕES.....	53
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54
7	ANEXOS.....	61

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma fruteira de grande relevância para o Brasil, pois destaca-se no contexto sócio-econômico, pelo valor nutritivo e comercial de seus produtos, principalmente para o semi-árido nordestino, já que se ajusta plenamente ao modelo de exploração conjunta com produtos de subsistência, como o feijão de corda, o milho e a mandioca. A cultura do caju tanto oferece uma fonte de renda, como permite a ocupação dos produtores no período de entressafra dessas culturas (SOUSA, 2009).

Esta cultura é de grande importância para a região Nordeste, pois é responsável por uma média de 50 mil empregos diretos, sendo 15 mil na indústria e 35 mil no setor rural (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Também viabiliza diversas agroindústrias através do beneficiamento de castanhas, sorvetes, produção de sucos, refrigerantes gaseificados, doces, licor, geléias, mel, cajuína e aguardentes, o que gera divisas para a Região.

O cultivo dessa espécie é realizado em países tropicais como Brasil, Índia, Vietnã e alguns outros do continente africano e tem como principal objetivo a obtenção de suas amêndoas comestíveis. A castanha de caju tem importância na nutrição humana como fonte de proteína e energia.

Na safra de 2007 a área plantada e a produção foram de 3.817.041 ha e 3.186.039 t, respectivamente, nos principais países produtores de castanha de caju, o Brasil ficou como o quarto maior produtor com 176.384 t, perdendo apenas para Índia (620.000 t), Nigéria (660000 t) e Vietnã (961000 t) (FAO, 2010). A Região Nordeste possui mais de 98% da área nacional ocupada com cajueiro (CRISÓSTOMO *et al.*, 2001), destacando-se os Estados do Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte por colherem cerca de 85% da produção de caju do país (IBGE, 2009).

Apesar da importância, a cajucultura vem mostrando diversos problemas, apresentando decréscimo na produtividade dos pomares, a qual já foi de 570 Kg/ha de castanhas em 1978 (AQUINO *et al.*, 2003) e nos últimos anos passou a ser de aproximadamente 290 Kg/ha (IBGE, 2010) com repercussão em toda a cadeia, desde o segmento produtivo à industrialização, pela falta de matéria-prima. Desta forma, há necessidade de reverter este quadro, para aumentar a lucratividade do setor produtivo e evitar ameaças de viabilidade deste agronegócio.

O programa de melhoramento do cajueiro compreende tipicamente as seguintes fases: introdução de plantas, teste de progênies, seleção individual e melhoramento por hibridação (BARROS *et al.*, 2002).

Para o início de um programa de melhoramento vegetal que atenda a problemática mencionada anteriormente, tornam-se necessário o conhecimento do germoplasma existente; a compreensão das relações entre os caracteres envolvidos com a produtividade e a escolha de métodos de seleção eficientes, determinantes para o sucesso de qualquer programa de melhoramento genético (DIAS, 2009).

A estrutura genética espacial e temporal das populações é determinada em parte pela forma de reprodução (HAMRICK, 1983). A reprodução pode ocorrer por cruzamentos aleatórios, cruzamentos biparentais, autofecundações, apomixia e suas combinações (SOUZA, 2003). O sistema de reprodução, juntamente com os mecanismos de dispersão de pólen e sementes, tem papel fundamental na determinação da estrutura genética de populações (HAMRICK E LOVELLESS, 1986). Seu conhecimento é de fundamental importância em programas de melhoramento e conservação genética porque permite delinear estratégias que otimizem a amostragem da variabilidade genética e a adoção de modelos genéticos-estatísticos adequados para a estimativa de parâmetros genéticos (SOUZA, 2003).

Para se estimar a taxa de cruzamento ou autofecundação de forma eficiente, é preciso analisar o sistema de cruzamento de um conjunto de progênies por meio de marcadores genéticos (CLEGG, 1980, apud RIBAS, 2003). Esse conjunto de informações pode ser utilizado para elucidar as variações locais dos parâmetros do sistema de cruzamento, conseqüentes de fatores ambientais e diferenças entre populações marginais e centrais, indicando mudanças microevolutivas seguindo o efeito fundador (SUN & RITLAND, 1998).

Marcadores moleculares têm sido amplamente empregados com sucesso na definição de grupos heteróticos em várias espécies vegetais, nos retrocruzamentos e na caracterização de acessos de germoplasma, auxiliando na seleção para o genitor recorrente e aumentando a eficiência do processo (RUMIN, 2005).

O uso dos marcadores moleculares como uma ferramenta no melhoramento de plantas marca um grande avanço no desenvolvimento de novas cultivares com importantes características agronômicas e de difícil avaliação. Marcadores moleculares podem ser empregados também na seleção de características de interesse. Neste caso, é

necessário primeiro identificar marcadores associados a essas características através do mapeamento molecular (MILACH, 1998). Uma vez que esta informação esteja disponível, é possível selecionar os indivíduos com o marcador de interesse, sem que haja necessidade de avaliar o fenótipo dos mesmos. Essa técnica, também conhecida como seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) (ESPINDOLA, 2004).

Os marcadores SSR são caracterizados por serem co-dominantes baseados em PCR, abundantes, aparentemente distribuídos por todo o genoma, multialélicos e dependentes de pequenas quantidades de DNA dos indivíduos analisados. O conteúdo genético informativo de um loco de um SSR é bastante alto por se tratarem de seqüências de alta taxa evolutiva. Mesmo em comparações de germoplasma com estreita base genética, geralmente detecta-se um alto número de alelos em um loco SSR. Marcadores SSR constitui uma ferramenta extremamente eficiente na identificação e na diferenciação de indivíduos. (BUSO *et al.*, 2003).

Dessa forma objetivou-se com esse trabalho obter informações sobre o sistema de reprodução de seis famílias de cajueiros pertencentes ao programa de melhoramento da Embrapa Agroindústria Tropical localizado em Pacajus – CE utilizando Marcadores microsatélites (SSR).

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Cajueiro**

#### **2.1.1 Classificação Botânica**

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é a espécie mais dispersa de seu gênero (BARROS *et al.*, 2002). É uma angiosperma, dicotiledônea, pertence à família Anacardiaceae, que é formada por 400 a 600 espécies de 60 a 74 gêneros (BARROS, 1993). Estes são predominantemente de árvores e arbustos tropicais e subtropicais, trepadeiras e de clima temperado. O cajueiro pertence ao gênero *Anacardium* que possui 21 espécies descritas pela taxonomia tipológica (BARROS, 1995) e encontra-se disperso em larga faixa do mundo tropical, compreendida entre os paralelos 27° N, no

sul da Flórida, e 28° S, na África do Sul. O nome caju é oriundo da palavra indígena “acaiú”, que, em tupi, quer dizer “noz que se produz”.

Além de *A. occidentale*, foram descritas pela taxonomia clássica 20 outras espécies de *Anacardium*, das quais três não ocorrem no Brasil: *A. excelsum* Skeels., dispersa no norte da América do Sul e na América Central até a Costa Rica (Satander & Albertin, 1980); *A. rhinocarpus* DC, encontrada na Colômbia, Venezuela e Panamá e *A. encardium* Noronha, identificada da Malásia. As principais zonas de dispersão destas espécies no Brasil são a Amazônia e o Planalto Central. Mitchell e Mori (1987) utilizando a taxonomia numérica reduziram a dez o número de espécies, sendo descrita, ainda, uma nova: *A. fruticosum*. Todas de ocorrência no Brasil, o que reforça, juntamente com diversas provas circunstanciais, a hipótese sobre a origem brasileira do cajueiro.

Depois da espécie cultivada, *A. microcarpum* Ducke, é a mais encontrada na região Nordeste, nos cerrados do Estado do Piauí e Maranhão, e é classificada por Mitchell e Mori (1987) como sendo variabilidade de *A. occidentale*. Esta espécie é típica dos campos altos, arenosos, secos, do baixo Amazonas paraense e da ilha de Marajó. É caracterizada como uma árvore pequena (4 a 6 m de altura), parecida com indivíduos de menor tamanho de *A. occidentale* L. As folhas, no entanto, são mais duras, com pecíolo mais aplainado e costa muito grossa. As inflorescências são menos densas. As flores aparecem no começo do verão e os frutos no meio deste. A castanha é muito pequena, excedida em tamanho pelo pedúnculo vermelho, ácido, aproveitável quando começa a secar depois de muito maduro (CORRÊA, 1926; DUCKE, 1939 apud LIMA, 1988).

### 2.1.2 Origem e Diversidade

Foram formuladas algumas hipóteses sobre a origem do cajueiro, principalmente, após Lineu, em 1753, ter denominado a espécie de *Anacardium occidentale*, por considerá-la nativa da América e da Ásia (MAGALHÃES, 1913). Tais hipóteses apoiavam-se em deduções sobre evidências, razão pela qual Alphonso de Candolle, 1959, numa avaliação crítica, considerou errônea tanto a hipótese sobre a origem indiana quanto a que considerava a origem asiática, embora soubesse que a planta ocorria na Índia e na costa de Malabar. Acreditava na hipótese da origem do cajueiro ser americano, argumentou contra a origem africana com a premissa da planta



ser encontrada em pequena diversidade de locais na África, diferente da América onde ocorria, em estado selvagem, em vastas extensões de diferentes habitats no Brasil, Guianas, Panamá e Antilhas.

Ressalta-se que as teorias atuais sobre a origem do cajueiro continuam fundamentadas em provas circunstanciais as quais apontam, convincentemente, o Brasil ou pelo menos o Norte da América do Sul e parte da América Central como o mais provável centro filogenético da espécie (BARROS E CRISÓSTOMO, 1995), sendo que Vavilov (1951) relacionou a planta como uma fruteira cultivada no Centro Brasil-Paraguai e Antilhas, embora Zeven e Zukhovsky (1975) sugeriram toda a América tropical, do México ao Peru, incluindo o Brasil e as Antilhas como centro de origem da espécie.

A origem brasileira do caju é aceita por quase todos os autores modernos que se dedicam ao seu estudo (TODA FRUTA, 2005). Também parece inquestionável que, dentro do território pátrio, tem como centro de origem e de dispersão o litoral nordestino (LIMA, 1988). Segundo Ferrão (1992), 70 a 80% das espécies do gênero se encontram no Norte e Nordeste, no litoral brasileiro.

Segundo Robertson (2002), ignora-se por quanto tempo os índios brasileiros têm utilizado a castanha e o pseudofruto do caju, mas é certo que eles já os utilizavam à época do descobrimento. O suco extraído do pseudofruto era fermentado para produzir vinho, e as castanhas eram assadas no fogo, com o intuito de se remover a parte tóxica, método que foi copiado pelos colonizadores portugueses.

O cajueiro é encontrado em praticamente todo o território brasileiro, concentrando-se nas zonas costeiras do Nordeste, adaptando-se melhor ao clima do litoral, onde pode-se observar grande variabilidade para os principais caracteres de interesse agroindustrial, como produção, peso do fruto, peso da amêndoa e peso do pedúnculo, caracterizando um centro de diversidade da espécie (BARROS, 1991), diferentemente dos demais países de ocorrência, mesmo aqueles onde a planta foi introduzida há mais tempo, como Índia, Moçambique, Tanzânia e Quênia, entre outros, onde a diversidade desses caracteres é menor (BARROS, 1988).

O principal centro de diversidade do gênero *Anacardium* é a região Amazônica, com um centro secundário de diversidade nos cerrados, no Planalto Central. Contudo, a maior diversidade de *Anacardium occidentale* L. encontra-se no Nordeste brasileiro (CRISÓSTOMO *et al.*, 2002).

### 2.1.3 Aspectos Morfológicos e Reprodutivos

O cajueiro é uma árvore perene, subcaducifólia de ramificação baixa e porte médio, onde a copa do cajueiro do tipo comum pode atingir altura de 5 a 8 metros e diâmetro médio de 12 a 14 metros. Mas dependendo das condições de clima, solo, salinidade, genótipo da planta, pode-se atingir cerca de 15 metros de altura e diâmetro maior que 20 metros em alguns casos (ARAÚJO et al, 1995).

O caule normalmente é grosso, tortuoso e ramificado a partir do nível do terreno. Os ramos também costumam ser tortuosos, compridos e muito ramificados (FERRÃO, 1995). A copa apresenta grande variação de formato e distribuição de ramos, sendo possível encontrar desde a forma ereta e compacta até a forma espaiada (BARROS, 1988).

As folhas são persistentes, de forma simples, inteiras, alternas e de aspecto subcoriáceo, sem espículas, glabras e curto-pecioladas, peninérveas com nervuras secundárias salientes na parte abaxial (FERRÃO, 1995).

A inflorescência (Figura 1-1) é uma panícula terminal, com flores hermafroditas (perfeitas) e masculinas (estaminadas), sendo assim, uma planta andromonóica (BARROS E CRISÓSTOMO, 1995), os dois tipos de flores são encontrados em quantidades e proporções diferentes, variando tanto entre plantas como dentro da mesma planta (BARROS, 1988a). O período de duração do florescimento vai variar conforme o genótipo e o ambiente, sendo que a abertura das flores masculinas tem maior duração do que a das hermafroditas, indo das 6 às 16 horas, enquanto nas hermafroditas concentra-se entre 10 e 12 horas (JOSEPH, 1979; BARROS, 1988 apud BARROS *et al.*, 2002a). A floração geralmente ocorre no final da época chuvosa, mas pode variar de acordo com o clima local e genótipo (FERRÃO, 1995).

O fruto do cajueiro é a castanha (Figura 1 - 2), classificado como um aquênio reniforme, aderido à planta por um pedúnculo hipertrofiado (BARROS, 1988). Inicialmente o fruto tem uma cor esverdeada, vai ficando avermelhada e por último torna-se acinzentada. Sua superfície é cerosa, brilhante e resistente, com várias pontuações escuras (FERRÃO, 1995). O pseudofruto (parte comestível) (Figuras 1 - 3,4 e 5) é conhecido como maçã do caju ou caju (BARROS, 1988). Este possui alto teor de água e é normalmente rico em vitamina C e açúcares quando maduro. Sua epiderme é muito fina e brilhante, de coloração variável, do amarelo ao vermelho, podendo também

ter pontuações (FERRÃO, 1995). O crescimento do fruto caracteriza-se por um início lento, uma fase acelerada até o ponto máximo e uma fase de redução do tamanho, até ser completada a maturação. (BARROS, 1988).

As raízes constituem-se de um sistema pivotante bem desenvolvido e um conjunto de raízes laterais concentrado (90%) entre 15 e 32 cm da superfície. As raízes se expandem lateralmente e chegam a quase 20 m de distância do caule, além de emitirem raízes verticais. A atividade das raízes apresenta maior efetividade a 15 cm de profundidade e a 2 m do caule. É de grande importância esse conhecimento para a aplicação em tratos culturais (FROTA *et al.*, 1991; WAHID *et al.*, 1989 apud BARROS *et al.*, 2002a).



**Figura 1** – 1. Inflorescências, 2. frutos jovens e 3. 4. 5. pseudofrutos. Fonte: Toda Fruta.

#### 2.1.4 Variabilidade de *Anacardium occidentale* L.

Em relação a duas características bem definidas, porte e precocidade, é possível identificar e agrupar o cajueiro em dois tipos: o comum e o anão precoce. O

mais difundido é o cajueiro comum (Figura 2), tanto naturalmente como por cultivo. Este apresenta porte elevado com altura variando de oito a quinze metros e envergadura da copa entre 12 a 16 m, podendo ultrapassar os vinte metros (BARROS, 1988b). O peso do fruto varia de 3 a 33 g, e o do pedúnculo, de 20 a 500 g. Em plantas propagadas por sementes a idade de estabilização da produção é entre 12 e 14 anos (CAVALCANTI *et al.*, 2009). A capacidade produtiva individual do cajueiro comum pode variar bastante, há dados de plantas que produzem apenas uns poucos frutos até aquelas com produções em torno de 100 kg de castanha por safra, não obstante existem informações, não oficialmente registradas, de plantas em áreas de produtor com produção de 400 kg de castanhas por safra (CRISÓSTOMO *et al.*, 1999).



**Figura 2** – Fotografia de um cajueiro do tipo comum. Fonte: CAVALCANTI, 2009.

O cajueiro tipo anão precoce (Figura 3), também conhecido por cajueiro de seis meses, caracteriza-se pelo porte baixo, copa homogênea com variação no tamanho de 5,0 a 6,5 m, altura abaixo de 4 m, diâmetro do caule e envergadura bem inferiores ao do tipo comum (BARROS, 1988b).

O ciclo de florescimento vai depender do tipo da planta e das condições ambientais. O cajueiro do tipo anão precoce floresce já no primeiro ano de vida,

normalmente aos 6 meses, o que caracteriza uma grande vantagem em relação ao tipo comum que normalmente tem seu florescimento no terceiro ano. Os clones melhorados de anão precoce, quando cultivados com irrigação, iniciam a sua produção já no primeiro ano, o que permite a colheita quando a produção se destina ao mercado de frutas de mesa (PAIVA *et al.*, 2003). Quando cultivada sob irrigação no semi-árido, alguns dos clones comerciais disponíveis produzem praticamente o ano todo.



**Figura 3** – Campo com cajueiros do tipo anão precoce. Fonte: CAVALCANTI, 2009.

O florescimento no cajueiro anão precoce estende-se por seis a oito, contra os cinco a sete meses do cajueiro do tipo comum. O peso do fruto em cajueiro do tipo anão precoce, em populações naturais, vai variar de 3 a 10g, e o do pedúnculo de 20 a 160g. Quando comparado ao tipo comum, a sua capacidade produtiva individual também é menor, com produção máxima registrada de 43 kg de castanha/safra/planta (BARROS, 1988).

As principais características destes dois tipos de cajueiros, comum e anão precoce, estão na Tabela 1.

**Tabela 1** - Principais características dos cajueiros dos tipos comum e anão precoce.

Características	Comum	Anão
Porte (m)	Alto (8-15)	Baixo (< 5)
Tamanho da copa (m)	> 7	5 a 7
Primeira Florada	2 a 5 anos	6 a 18 meses
Variação do peso da castanha (g)	3 a 33	3 a 13
Variação do peso do pendúculo (g)	20 a 500	20 a 160
Produção: castanha/planta/safra (kg)	<1 a > 100	até 43

Fonte: (CAVALCANTI *et al.*, 2009).

### 2.1.5 Importância sócio-econômica

O cajueiro é uma das principais fruteiras cultivadas no Brasil com destaque no contexto sócio-econômico pelo alto valor nutritivo e comercial de seus produtos, especialmente no Nordeste, onde 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 rural (OLIVEIRA *et al.*, 2002), além de 250 mil empregos indiretos nos dois segmentos e viabiliza diversas agroindústrias através do beneficiamento de castanhas, produção de sucos, sorvetes, doces, licor, mel, geléias, cajuína, refrigerantes gaseificados, e aguardentes (Figura 4), gerando lucros para a Região.



**Figura 4** - Produtos derivados do caju.

A produtividade do cajueiro é expressiva na região Nordeste do Brasil, principalmente, após o surgimento do tipo “anão-precoce”, que vem substituindo o cajueiro comum, por proporcionar maior produtividade, facilitar a colheita e a condução

dos pomares devido seu porte baixo, uniformidade da castanha, do pedúnculo e da produção permitindo uma exploração comercial e contribuindo assim para o aumento da área plantada (BARROS E CRISOSTÓMO, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2002; ROSSETTI E AQUINO, 2002).

O plantio de castanha na região Nordeste corresponde a uma área superior a 750.000 ha (IBGE, 2010), sendo responsável por mais de 95% da produção nacional, onde os estados do Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte e Bahia são os principais produtores. Para o semi-árido dessa região, a importância é ainda maior, pois os empregos direcionados para o campo são gerados na entressafra das culturas tradicionais como milho, feijão e algodão, reduzindo assim, o êxodo rural (MONTENEGRO *et al.*, 2003).

Estima-se que 90% das amêndoas de castanha de caju (AAC) produzidas no Brasil são destinadas à exportação que constituem a base de sustentação econômica do agronegócio de caju brasileiro. Os EUA e o Canadá são os principais mercados consumidores de amêndoa brasileira, sendo responsáveis por cerca de 85% das importações (OLIVEIRA, *et al.*, 2002). O agronegócio do caju no mundo movimenta cerca de 2,4 bilhões de dólares por ano (MONTENEGRO *et al.*, 2003).

Além da castanha, do cajueiro também pode ser obtido o pedúnculo do fruto, que vem se tornando, paulatinamente, importante segmento da agroindústria do caju. Verifica-se um crescente aumento das vendas, apontando para a conquista de novos mercados com a oferta de 30 subprodutos, dos quais se destacam o suco concentrado, hoje o mais vendido no País, doces, refrigerantes gaseificados e cajuína. Podemos destacar como outro fator responsável por essa tendência, a expansão do consumo do pedúnculo *in natura*, atraindo novos e importantes mercados (PAIVA E BARROS, 2004).

## **2.2 Melhoramento Genético do Cajueiro**

### **2.2.1 Histórico**

O melhoramento genético do cajueiro anão precoce no Brasil deu início com a introdução de plantas no Campo Experimental de Pacajus, em 1956. E posteriormente, com a seleção fenotípica individual com controle anual da produção, clonagem e

avaliação clonal. Embora simples e de ganhos genéticos esperados reduzidos, esta metodologia permitiu o lançamento comercial dos clones CCP 06 e CCP 76, em 1983, e CCP 09 e CCP 1001, em 1987, ainda considerados até hoje os principais clones comerciais disponíveis (BARROS *et al.*, 1984; BARROS *et al.*, 1988; BARROS E CRISÓSTOMO, 1995; ALMEIDA *et al.*, 1993 apud PAIVA E BARROS, 2004).

Posteriormente, utilizando-se de novos procedimentos metodológicos, foi possível a obtenção dos clones EMBRAPA 50, EMBRAPA 51, BRS 189 e BRS 226. Estes novos procedimentos metodológicos incluem: o método do policruzamento, a seleção entre e dentro de progênes e a hibridação inter e intraespecífica (BARROS *et al.*, 2000b; BARROS *et al.*, 2002; PAIVA *et al.*, 2002 apud PAIVA E BARROS, 2004).

Podem-se organizar a domesticação e as atividades de melhoramento genético do cajueiro, no Brasil, cronologicamente em cinco fases distintas (PAIVA *et al.*, 1997 apud SANTOS, 2006). A primeira fase remonta à época da descoberta, pelos nativos, de plantas com pedúnculos apropriados à sua alimentação no consumo *in natura*, na elaboração de bebidas e até mesmo no uso da própria castanha para consumo da amêndoa. Os registros demonstram a existência desse processo já no século XVII (CRISÓSTOMO *et al.*, 1999).

A segunda fase data das décadas de 40 e 50 do século passado, marcadas pela extração de óleo de castanha de caju (LCC) e pela transformação do pedúnculo em diversos produtos, em um sistema mais organizado e também as primeiras introduções de plantas no Campo Experimental de Pacajus (CE), oriundas de populações naturais da região litorânea do Nordeste (PAIVA *et al.*, 1997 apud SANTOS, 2006).

A terceira fase compreende as décadas de 60 e 70, e caracteriza-se por grandes plantios comerciais utilizando-se apenas o cajueiro comum, no plantio direto de sementes ou na formação de mudas de pé franco em espaçamentos definidos. Este ocorreu em decorrência de um programa de expansão da cajucultura, a partir de incentivos governamentais para o desenvolvimento da cultura. Ainda nesse período as atividades de pesquisas centraram-se na identificação e no controle da produção de castanha de plantas individuais. Após a identificação das plantas que se destacavam em produção, seguiu-se a formação de novos plantios com sementes colhidas destas plantas mais produtivas (CRISÓSTOMO *et al.*, 1999).

Seguiu-se então para a quarta fase, onde foram obtidos e avaliados clones - conjunto de indivíduos com as mesmas características genéticas - dos tipos comum e



anão precoce, o que culminou com a recomendação dos clones CCP 06, CCP 76, CCP 09 e CCP 1001, todos do tipo anão precoce, para o plantio comercial. Em consequência disso, a produtividade de castanha saltou de 379,4 kg/ha (média do período 1958-1995) para cerca de 1.200 kg/ha. A partir dessa época, a pesquisa priorizou a seleção de plantas do tipo anão precoce, porém constatou-se que a base genética desse material era estreita, resultado do baixo número de plantas introduzidas, originadas de um único local. Sendo essa situação muito indesejável, não só pela dificuldade para obter novos ganhos de seleção, mas também pelos riscos de vulnerabilidade genética. Desta forma, para ampliar a base genética dos caracteres de interesse agroindustrial a Embrapa Agroindústria Tropical introduziu e selecionou plantas em populações segregantes, efetuando a recombinação genética pelo método do policruzamento e hibridação artificial entre plantas superiores do tipo anão precoce e entre cruzamentos dos tipos anão e comum (BARROS E CRISÓSTOMO, 1995).

Na quinta fase, as pesquisas priorizam à demanda atual da cajucultura, focando-se na fruticultura irrigada e no aproveitamento, também, do pedúnculo para o consumo *in natura*. Com estes objetivos, a seleção tem de estar orientada para plantas de porte baixo, a fim de facilitar a colheita; pedúnculos com coloração, sabor, textura, maior período de conservação e consistência e teor de tanino adequados às preferências do consumidor; facilidade de destaque do pedúnculo; rendimento maior ou igual a 28 %; facilidade na despeliculagem; coloração dentro dos padrões internacionais; castanha de tamanho e peso adequados (> 10 g); e amêndoas resistentes à formação de “bandas”. Na etapa de avaliação dos clones, recomenda-se testá-los tanto em condições tanto de irrigação como de sequeiro, em diferentes ecossistemas (BARROS *et al.*, 2002). A preferência dos consumidores é para pedúnculos com peso variando de 100 a 140 gramas, coloração vermelha ou tons avermelhados (BARROS *et al.*, 2000).

### **2.2.2 Propriedades Genéticas**

O êxito de qualquer programa de melhoramento depende do conhecimento de parâmetros genéticos da população a ser melhorada. A eficiência do método de melhoramento depende tanto do mecanismo genético envolvido na herança do carácter a ser melhorado, como do número de genes que o influenciam, dos efeitos e ações dos

genes, da herdabilidade, da repetibilidade e das associações com outros caracteres (RESENDE, 2002).

A recombinação genética é um processo crucial no melhoramento genético de plantas. Durante a meiose, os cromossomos homólogos trocam segmentos de DNA, resultando em novas combinações de alelos. Este fenômeno é conhecido como *crossing-over* e é essencial para a criação de diversidade genética nas populações. No contexto do melhoramento genético de plantas, a recombinação genética permite a combinação de características desejáveis de diferentes plantas parentais em suas descendentes. Isso amplia a variabilidade genética, possibilitando o desenvolvimento de novas variedades com combinações únicas de características, como resistência a doenças, produtividade aumentada, e adaptações a condições ambientais específicas. A importância da recombinação genética no melhoramento de plantas é que ela permite que os melhoristas combinem genes de interesse em novas combinações que podem não ocorrer espontaneamente na natureza. Isso é fundamental para a criação de variedades de plantas que atendam às necessidades agrícolas e ambientais (ACQUAAH, 2007).

O método de policruzamento ("polycross") foi proposta por Tysdal, Kiesselbach e Westever, em 1942, para designar a progênie obtida de sementes de uma linha que foi submetida ao cruzamento com outras linhas selecionadas e cultivadas num mesmo campo (ALARD, 1971, apud CRISÓSTOMO *et al.*, 1999). Em essência, o método consiste em possibilitar o intercruzamento natural entre todos os genótipos selecionados, os quais são arranjados em um campo isolado para que não ocorra contaminações com pólen de plantas que não do campo de policruzamento. O método foi concebido para plantas alógamas que podem ser reproduzidas vegetativamente, objetivando arranjar os genótipos clonados, de forma que todos tenham a possibilidade de polinizar e serem polinizados ao acaso pelos demais. Com o possível intercruzamento de todos os genótipos, aumentam se as chances de se obter novas combinações gênicas e, conseqüentemente, as possibilidades de seleção de genótipos favoráveis. As sementes colhidas são chamadas policruzadas e as progênies resultantes do plantio das mesmas são também chamadas do policruzados (HITLLE, 1954 apud CRISÓSTOMO *et al.*, 1999).

O método do policruzamento começou a ser empregado no melhoramento do cajueiro na Estação Experimental de Pacajus-CE, no ano de 1978, com o objetivo de obter combinações favoráveis para porte baixo, precocidade, produção e peso da

castanha em genótipos do tipo anão precoce (BARROS E ALMEIDA, 1984, apud CRISÓSTOMO *et al.*, 1999).

Nos programas de melhoramento genético de espécies alogamas são necessárias informações sobre o efeito dos danos provocados pela depressão por endogamia, que é um fenômeno genético inverso ao da heterose caracterizado pela perda de vigor, devido a homozigose de genes deletérios, sendo a autofecundação a forma mais intensa de endogamia (Figura 5) (METTLER E GREGG, 1973, apud PAIVA *et al.*, 1998).



**Figura 5** - Exemplo do vigor de híbrido (heterose) e da depressão por endogamia no cajueiro. Pacajús, CE. Fonte: (CAVALCANTI *et al.*, 2009).

O sistema reprodutivo da espécie é predominantemente alogâmico, ou seja, a fecundação é preferencialmente cruzada. No entanto, a presença e a abertura simultânea dos dois tipos de flores na mesma planta e na mesma panícula podem favorecer a autopolinização e, conseqüentemente, a endogamia (BARROS, 1988).

Comparando progênies de clones de cajueiro anão precoce originárias de autofecundações, polinização livre e de cruzamentos controlados, aos 12, 18 e 29 meses, Paiva *et al.*, (1998) encontrou efeitos de depressão por endogamia sobre as características vegetativas e de produção. Os resultados apontaram reduções significativas de até 15,4% no caráter altura da planta, 48% na produção, 11,6% no peso da castanha, 19,5% no diâmetro da copa e 12,4% no peso da amêndoa.

Por outro lado, já foram evidenciados ocorrência de vigor híbrido no cajueiro para diversas características, entre elas, foi relatado o incremento de 153% para produção de castanhas em plantas derivadas de cruzamentos (DAMODARAN, 1975). Este fenômeno também foi detectado para os caracteres, peso da castanha, produção e amêndoa (MANOJ E GEORGE, 1993). Cavalcanti *et al.* (2000) avaliaram a heterose em plantas oriundas do cruzamento entre os tipos comum e anão precoce; e constataram efeitos de 32% para diâmetro, 20% para a altura da planta, 192% para produtividade, 121% para números de castanha por planta, 15% para peso da castanha e 19% para peso da amêndoa.

O método de melhoramento de seleção recorrente de famílias de meio-irmãs é atualmente o mais empregado no melhoramento do cajueiro devido sua praticidade, a utilização da hibridação para a exploração da heterose apresenta-se como uma estratégia de grande potencial e deve ser explorada, apesar da baixa porcentagem de sucesso no pegamento dos cruzamentos, em torno de 5% apenas. No entanto, com a possibilidade de propagação vegetativa no cajueiro, o vigor híbrido presente nas novas combinações, é capitalizado em sua totalidade, logo na primeira geração, pela seleção e clonagem dos indivíduos superiores.

A seleção recorrente recíproca, conforme descrita por Comstock, Robinson e Harvey (1949), é uma metodologia de melhoramento genético projetada para maximizar simultaneamente a habilidade combinatória geral (ACG) e a habilidade combinatória específica (ACE) em programas de melhoramento de plantas. Este método envolve cruzamentos entre duas populações parentais distintas, onde os descendentes híbridos resultantes são avaliados quanto ao seu desempenho, permitindo a identificação das linhagens com maior ACG e ACE. As linhagens selecionadas são então utilizadas em cruzamentos subsequentes dentro de cada população parental, repetindo o ciclo ao longo de várias gerações. A principal vantagem da seleção recorrente recíproca é a sua capacidade de aprimorar tanto o potencial genético geral quanto as interações específicas entre linhagens, tornando-a uma ferramenta particularmente eficaz em programas de melhoramento que visam a produção de híbridos, onde ambos os tipos de habilidades combinatórias são essenciais para maximizar o ganho genético (COMSTOCK *et al.*, 1949).

Nesse sentido, o emprego da seleção recorrente recíproca (COMSTOCK *et al.*, 1949), usando as populações de cajueiro do tipo anão e o comum, pela maior base

genética presente neste tipo, torna-se uma estratégia bastante propícia e oportuna. Além disso, o programa de melhoramento do cajueiro da Embrapa Agroindústria Tropical tem dado ênfase a geração de híbridos simples, duplos e triplos para exploração da heterose (CAVALCANTI E BARROS, 2009).

### 2.3 Marcadores Moleculares

O programa de melhoramento genético tem alcançado excelentes resultados, especialmente nas últimas décadas, pois tem sido beneficiado com o desenvolvimento de métodos biotecnológicos, principalmente, aqueles relativos ao uso de marcadores moleculares. Esse método consiste na integração de informações da genética molecular com a seleção fenotípica e se constitui em uma das mais potentes estratégias para o melhoramento de plantas (LANDE, R; THOMPSON, R. 1990).

Para Ferreira e Grattapaglia (1998), um marcador molecular é definido como todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA, correspondendo a regiões expressas ou não do genoma. De forma semelhante, Zimmer *et al.*, (2005) conceituam marcador molecular como um segmento específico de DNA, cuja seqüência básica difere para diferentes genótipos (polimorfismo) e, portanto, permite diferenciá-los. Contudo, para que o marcador molecular seja considerado marcador genético é necessário que o desempenho do mesmo esteja de acordo com as leis básicas de herança de Mendel (FERREIRA, 2003).

Outro fato importante em relação ao desenvolvimento dos marcadores moleculares, é que contribuem para os estudos da genética de populações e melhoramento genético, pois torna possível a análise de cada população, ou indivíduo de interesse, num pequeno espaço de tempo, tornando viável a utilização de qualquer forma alélica - fragmento de DNA ou expressão de uma proteína codificada a ele - originada de um genoma como marcador genético (SOUZA JUNIOR, 2001).

Os marcadores moleculares tem sido utilizados com sucesso na definição de grupos heteróticos em várias espécies vegetais, nos retrocruzamentos e na caracterização de acessos de germoplasma, auxiliando na seleção para o genitor recorrente e aumentando a eficiência do processo (RUMIN, 2005). A partir de então, são feitas associações entre marcadores moleculares ligados a caracteres agrônômicos

de interesse industrial de forma útil e efetiva, graças ao avanço da biologia molecular. O gene ou grupos de genes que contribuem para caracteres poligênicos, tais como produção, qualidade do fruto e arquitetura da planta, são conhecidos como “*Quantitative Trait Loci*” (QTLs), ou seja, locos que controlam caracteres quantitativos (LANDE, R; THOMPSON, R. 1990).

O uso dos marcadores moleculares como uma ferramenta no melhoramento de plantas marca um grande avanço no desenvolvimento de novas cultivares com importantes características agrônômicas e de difícil avaliação. Marcadores moleculares podem ser empregados também na seleção de características de interesse. Neste caso, é necessário primeiro identificar marcadores associados a essas características através do mapeamento molecular (MILACH, 1998). Uma vez que esta informação esteja disponível, é possível selecionar os indivíduos com o marcador de interesse, sem que haja necessidade de avaliar o fenótipo dos mesmos. Essa técnica, também conhecida como seleção assistida por marcadores moleculares (SAM), pode ter grande impacto nos casos em que a característica de interesse é de difícil avaliação e custo elevado principalmente em plantas perenes (ESPINDOLA, 2004).

Atualmente, há várias técnicas que envolvem marcadores moleculares que podem auxiliar o melhoramento genético dos vegetais. Dentre essas está o polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP); o polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD); polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP); polimorfismo resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetidos detectados por meio de marcadores microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeat) e marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeats); polimorfismos obtidos a partir do sequenciamento de regiões do DNA ribossômico nuclear (nrDNA) (ZIMMER *et al.*, 2005); e polimorfismos de base única - *single-nucleotide polymorphism* (SNP). Estes polimorfismos são gerados de forma aleatória no genoma ou em genes expressos. que, por sua vez, têm possibilitado a construção de plataformas para análise de centenas de milhares de marcadores em paralelo, a um custo reduzido GUIMARÃES *et al.*, 2009). Os marcadores moleculares ideais são aqueles que possuem elevado polimorfismo entre dois genótipos, são facilmente visualizados, possuem herança co-dominante, são estáveis no decorrer das gerações e são distribuídos de maneira uniforme por todo o genoma (ZIMMER *et al.*, 2005).

Abaixo segue uma breve revisão dos principais marcadores moleculares, caracterizando suas vantagens e limitações:

- RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphisms)

O RFLP foi o primeiro tipo de marcador de DNA utilizado no melhoramento de plantas (HELENTJARIS *et al.*, 1986). Os fragmentos obtidos são separados por eletroforese e transferidos para uma membrana de celulose ou náilon. Em seguida, fragmentos específicos podem ser detectados pela incubação da membrana com uma sonda previamente marcada (radioativamente ou a frio). Sonda é uma seqüência de DNA (normalmente da própria espécie em estudo) que irá, por complementaridade entre as bases nitrogenadas, parear com um ou mais dos fragmentos contidos na membrana. A posição da membrana onde a sonda hibridiza pode ser determinada por autorradiografia. O polimorfismo entre diferentes indivíduos decorre de variações nas seqüências primárias dos sítios de restrição ou na mudança de suas posições devido a inserções e/ou deleções. As dificuldades inerentes à técnica, o grande número de etapas e o uso, em muitos casos, de sondas radioativas, impedem que o RFLP seja extensivamente utilizado no melhoramento. As dificuldades inerentes à técnica, o grande número de etapas e o uso, em muitos casos, de sondas radioativas, impedem que o RFLP seja extensivamente utilizado no melhoramento (ALZATE-MARIN, 2005).

- RAPD (Random Amplified polymorphic DNA)

O marcador RAPD também conhecido como AP-PCR (Arbitrarily Primer-PCR) foi desenvolvido nos anos 90, independentemente, por dois grupos de pesquisadores. O RAPD é uma variação da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) que utiliza um único iniciador de dez nucleotídeos com seqüência arbitrária. Com isso, para que um fragmento de DNA seja amplificado, duas regiões complementares ao iniciador devem estar separadas por até 2000 pb em orientações opostas, de forma a amplificar os fragmentos de DNA, distribuídos ao acaso no genoma, sem a necessidade de um conhecimento prévio do DNA (LANZA *et al.*, 2000).

Os resultados da análise de RAPD em plantas indicam que a herança dos marcadores RAPD é de natureza dominante, devido ao fato de diferentes alelos de um mesmo gene não serem identificados utilizando estes marcadores (ZIMMER *et al.*,

2005). Porém, para Ferreira (2003), a técnica de RAPD não apresenta sensibilidade quantitativa suficiente para discriminar homozigotos e heterozigotos. Já para Xavier *et al.* (2005), a técnica RAPD é rápida, barata e informativa, não necessitando do conhecimento prévio da sequência de DNA alvo, amplifica as seqüências de DNA a partir de um par de iniciadores de seqüência arbitrária.

Há uma série de vantagens dos marcadores RAPD se comparado ao marcador RFLP, tais como: a técnica RAPD não requer a construção de uma biblioteca genômica, de forma que um único conjunto de iniciadores pode ser utilizado para qualquer organismo; para a utilização dos marcadores RAPD, necessita-se somente de uma pequena quantidade de DNA; não precisa do uso de isótopos radioativos ou marcação não-radioativa; apresenta custo mais baixo, em virtude dos gastos com mão-de-obra, reagentes e suplementos serem menores e não necessitar de instalações sofisticadas de laboratório; e é uma técnica mais sensível na detecção de polimorfismo em nível de DNA (DIAS, 2009).

Contudo, os marcadores RAPD apresentam algumas limitações, destacando: o baixo conteúdo de informação genética por loco, onde apenas um alelo é detectado, o segmento que é amplificado, enquanto que as demais variações alélicas são classificadas como alelo nulo; a impossibilidade de discriminar genótipos heterozigotos de homozigotos, ou seja, herança dominante; e o desconhecimento prévio da base genética das bandas, que pode ser limitante em alguns casos (DIAS, 2009).

- AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

O polimorfismo gerado por marcadores AFLP é proveniente de mutações pontuais, inversões, deleções e inserções de bases na fita de DNA, as quais geram modificações (perdas ou ganhos) nos sítios de restrição, alterações nas seqüências reconhecidas pelas bases seletivas no extremo 3' dos iniciadores utilizados para a amplificação, ou alteram o tamanho do fragmento gerado. (ZIMMER *et al.*, 2005)

Segundo Milach (2002), a técnica de AFLP possui grande capacidade para detecção de variabilidade genética e uso em caracterização de cultivares, porém há outras vantagens, dentre elas: apresenta um grande número de fragmentos que são gerados e visualizados em um único gel, proporcionando uma amostragem ampla e simultânea de um genoma; apresenta, também, grande poder de detecção de variabilidade genética, pois explora o polimorfismo de presença e ausência de sítios de



restrição como no ensaio de RFLP; e a ocorrência ou não de amplificação a partir de seqüências arbitrárias como na técnica de RAPD.

Já as principais limitações dessa técnica são: a impossibilidade de diferenciar genótipos heterozigotos dos homozigotos, pelo fato de apresentar herança dominante; exigir a necessidade de preparação das amostras para o trabalho, envolvendo as etapas de digestão, ligação de adaptadores e pré-amplificação.

- ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

Os marcadores ISSR envolvem a PCR para amplificar regiões entre microssatélites idênticos inversamente orientados. Os iniciadores são construídos a partir das próprias seqüências simples repetidas (SSR) proporcionando amplo arranjo de possíveis produtos amplificáveis (SOUFRAMANIEN; GOPALAKRISHNA, 2004).

Esse método foi inicialmente proposto por Zietkiewicz *et al.* (1994) não sendo necessário nenhum conhecimento a priori do genoma para a sua utilização. As repetições usadas como iniciadores podem ser dinucleotídeos, trinucleotídeos, tetranucleotídeos ou pentanucleotídeos. Os iniciadores ISSR podem ou não ser ancorados, sendo geralmente ancorados em um seguimento de bases arbitrárias e/ou degeneradas, localizado em uma das extremidades (3' ou 5') da seqüência repetitiva (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994; REDDY *et al.*, 2002).

Os marcadores ISSR apresentam uma série de vantagens, tais como: requerem pouca infra-estrutura em termos de equipamento de laboratório para execução dos experimentos; a amplificação não requer informações de sucessão do genoma e de padrões altamente polimórficos; as seqüências-alvo dos ISSRs são abundantes ao longo do genoma de eucariontes e evoluem rapidamente; é um marcador molecular universal podendo ser utilizado em diversas espécies; não necessita de um sistema de resolução sofisticado e laborioso, podendo ser utilizado o gel de agarose com brometo de etídeo.

Contudo, a principal limitação desses marcadores é a não diferenciação entre indivíduos homozigotos e heterozigotos; além de outras limitações quando comparado com marcadores co-dominantes, como os microssatélites.

## Marcadores Microssatélites

Microssatélites ou Sequências Simples Repetidas (SSR) são seqüências de DNA com comprimento repetido de poucos pares de bases. Variações no número de repetições podem ser detectadas com PCR pelo desenvolvimento de iniciadores que rodeiam o microssatélite (LI *et al.*, 2001). A seqüência de DNA que flanqueia estas regiões contendo o microssatélite é conservada dentro de uma espécie, permitindo a seleção de iniciadores que na PCR amplificam a região que contém o microssatélite (LANZA *et al.*, 2000).

Os marcadores SSR são caracterizados por serem co-dominantes baseados em PCR, abundantes, aparentemente distribuídos por todo o genoma, multialélicos e dependentes de pequenas quantidades de DNA dos indivíduos analisados. O conteúdo genético informativo de um loco de um SSR é bastante alto por se tratarem de seqüências de alta taxa evolutiva (BUSO *et al.*, 2003). Isto ocorre porque as regiões microssatélites são regiões instáveis do genoma, que estão sob alterações mutacionais, geralmente do tipo adição ou deleção de repetições em taxas mais elevadas que as observadas nas seqüências de DNA não repetitivo, sendo que esta taxa pode chegar até uma a cada 1000 pb. Essa instabilidade gera um grande número de locos polimórficos (Zucchi, 2002). Mesmo em comparações de germoplasma com estreita base genética, geralmente detecta-se um alto número de alelos em um loco SSR (BUSO *et al.*, 2003)

Em genomas de eucariotos, estas seqüências simples são mais freqüentes, melhor distribuídas ao acaso e formam locos gênicos muito mais polimórficos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998), tal polimorfismo observado nos marcadores microssatélites é obtido em virtude do número diferente de repetições das seqüências simples (TANYA *et al.*, 2001). Os fragmentos gerados da amplificação podem ser observados tanto em gel de agarose corado com brometo de etídeo, quanto em gel de poliacrilamida, visualizados radioativamente ou corado com nitrato de prata.

Segundo Li *et al.*, (2001) os marcadores microssatélites possuem várias características desejáveis de outros marcadores, incluindo: alto nível de polimorfismo e conteúdo de informação; são freqüentemente distribuídos ao acaso; alta reprodutibilidade; herança codominante e multialelismo; cada loco microssatélite é analisado individualmente ao se utilizar o par de iniciadores construído especificamente para a sua amplificação.

Entretanto, em relação aos outros marcadores, a maior limitação dos marcadores SSRs, encontra-se na grande quantidade de trabalho necessário para o seu desenvolvimento, exigindo conhecimento prévio do genoma, pessoal especializado e equipamento sofisticado para sequenciamento automático. (FERREIRA E GRATAPAGLIA, 1998)

Marcadores SSRs foram usados para avaliar a diversidade genética em populações de plantas frutíferas, como videiras (SEFC *et al.*, 2000), macieiras (HOKANSON *et al.*, 1998), bananeiras (CRESTE *et al.*, 2003), entre outras. Esses estudos ajudaram a identificar variedades, estudar a estrutura populacional e conservar recursos genéticos.

Cavalcanti (2004) e Cavalcanti E Wilkinson (2007), utilizaram marcadores moleculares do tipo AFLP e microssatélites na construção de mapas de ligação de *Anacardium* com o objetivo de identificar QTLs para uso na seleção assistida por marcadores.

## 2.4 Taxa de Cruzamento

O sistema de reprodução é a forma como espécies deixam seus descendentes, este é de extrema importância para compreender os padrões de fluxo gênico e a diferenciação genética entre e dentro de populações (BAWA 1974, CLEGG 1980, HAMRICK, 1989). O estudo dos sistemas de reprodução pode fornecer informações importantes sobre os padrões de cruzamentos, a dinâmica dos processos micro evolucionários e quais as melhores formas para a conservação e manejo dessas espécies (OLIVEIRA, 2002).

O sistema de cruzamento é de fundamental importância para determinar a composição genética das populações. Ele regula a distribuição genética entre progênies, populações e subdivisões de uma população; e dentro dessas. Adicionalmente, determina a associação entre progênies e o grau de parentesco entre seus descendentes, bem como afeta a heterogeneidade genética espacial existente entre populações naturais (HAMRICK, 1983, apud RIBAS, 2003).

O ponto principal na análise da organização genética das populações é o sistema de cruzamento, pois a determinação dos padrões pelos quais os gametas são transportados de geração para geração exerce um controle primário sobre as distribuições das frequências genotípicas e afeta o potencial de recombinação das

populações, moderando ou acelerando a taxa de produção de novas combinações gênicas e a perda de algumas já existentes (ALLARD, 1971).

O sistema de cruzamento é determinado pela taxa de autofecundação, cruzamentos correlacionados, padrão de distribuição de indivíduos parentes e pelas características do fluxo gênico da espécie (ELLSTRAND, 1992).

De acordo com Shaw & Allard (1982), os sistemas de cruzamento em plantas, geralmente, são descritos pelo modelo misto de cruzamento, no qual se determina a proporção de progênies provenientes de autofecundação ( $s$ ) e de fecundação cruzada ( $t=1-s$ ). As estimativas dos parâmetros do sistema misto de cruzamento, taxa de cruzamento ( $t$ ) e taxa de autofecundação ( $s$ ) são necessárias para que sejam utilizadas estratégias adequadas na obtenção de variedades melhoradas e se avalie a viabilidade de tais estratégias, definindo o tipo de variedade a ser recomendada para cultivo comercial como linhagens, híbridos e clones.

Para se estimar a taxa de cruzamento ou autofecundação de forma eficiente, é preciso analisar o sistema de cruzamento de um conjunto de progênies por meio de marcadores genéticos (CLEGG, 1980, apud RIBAS, 2003). Esse conjunto de informações pode ser utilizado para elucidar as variações locais dos parâmetros do sistema de cruzamento, conseqüentes de fatores ambientais e diferenças entre populações marginais e centrais, indicando mudanças microevolutivas seguindo o efeito fundador (SUN E RITLAND, 1998). O efeito fundador, conforme descrito por Sun e Ritland (1998), refere-se a uma redução na variabilidade genética que ocorre quando uma nova população é estabelecida por um pequeno número de indivíduos de uma população maior. Esse fenômeno resulta na perda de alelos raros e na redução da heterozigosidade, uma vez que a nova população reflete apenas uma amostra limitada da diversidade genética original. Como consequência, a população fundada pode apresentar diferenças significativas em termos de estrutura genética e adaptabilidade em comparação com a população de origem, o que pode influenciar a evolução e a capacidade de resposta a pressões seletivas.

Marcadores dominantes, como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), podem ser utilizados para avaliar taxas de cruzamentos. Estudos demonstraram que eles podem ser eficazmente empregados em estimativas de taxa de cruzamento em populações naturais (NYBOM E BARTISH, 2000). Embora úteis, os marcadores RAPD, em determinadas aplicações, apresentam limitações significativas que impactam

sua eficácia na avaliação de taxas de cruzamento e outras análises genéticas. De acordo com Nybom e Bartish (2000), uma das principais limitações é a incapacidade desses marcadores em distinguir entre indivíduos heterozigotos e homozigotos dominantes, o que pode resultar em uma subestimação da diversidade genética e em imprecisões na inferência de padrões de cruzamento. Além disso, os RAPDs são conhecidos por sua baixa reprodutibilidade, com resultados que podem variar entre laboratórios ou mesmo em replicações dentro do mesmo laboratório, comprometendo a consistência e a confiabilidade dos dados. Outra limitação importante é a natureza anônima dos loci detectados pelos RAPDs, que não fornecem informações sobre a localização genética ou a função dos loci, dificultando a interpretação biológica dos resultados. Essas restrições tornam os RAPDs menos adequados para estudos que exigem alta precisão e confiabilidade na análise genética (NYBOM E BARTISH, 2000).

Marcadores co-dominantes, como os SSRs, permitem a identificação do genótipo - homozigoto ou heterozigoto - sem a necessidade de testes de progênie e, além disso, os processos de estimação baseados nesse tipo de marcadores são mais eficientes. O número de locos analisados está relacionado à precisão das estimativas. Em geral, analisando-se um maior número de locos, pode-se atingir estimativas mais precisas. Bem como ser possível obter e comparar taxas de cruzamento verificadas a partir de locos individuais e de locos múltiplos para mais informações sobre a endogamia (LOPES *et al.*, 2002).

Os marcadores co-dominantes SSR (Simple Sequence Repeats) têm se destacado como uma ferramenta altamente eficaz na avaliação da taxa de cruzamento em plantas, oferecendo várias vantagens em relação aos marcadores dominantes. Primeiramente, os SSRs permitem a distinção clara entre indivíduos heterozigotos e homozigotos, fornecendo uma estimativa precisa da diversidade genética dentro de uma população, o que é crucial para a avaliação acurada das taxas de cruzamento (POWELL *et al.*, 1996). Além disso, os SSRs são altamente polimórficos e possuem uma ampla distribuição no genoma, o que aumenta a probabilidade de detectar variações genéticas significativas em estudos populacionais (GUPTA & VARSHNEY, 2000). Esses marcadores também são altamente reprodutíveis, possibilitando resultados consistentes entre diferentes laboratórios e em diferentes experimentos, uma característica essencial para a validação de dados em estudos de genética de populações (ZANE *et al.*, 2002). Por fim, a capacidade dos SSRs de fornecer informações sobre a localização exata dos

loci genéticos torna esses marcadores particularmente valiosos para a compreensão das bases genéticas subjacentes às taxas de cruzamento e para a identificação de loci ligados a características de interesse agrônômico (Zane *et al.*, 2002).

Em plantas, como o cajueiro anão precoce, o uso de marcadores co-dominantes SSR (Simple Sequence Repeats) na avaliação da taxa de cruzamento oferece inúmeras vantagens que são cruciais para a compreensão e manejo da variabilidade genética em programas de melhoramento. Esses marcadores permitem a distinção entre indivíduos heterozigotos e homozigotos, proporcionando uma estimativa precisa da taxa de cruzamento, o que é fundamental para a detecção precoce de endogamia em progênies meio-irmãs (Powell *et al.*, 1996). A alta polimorfismo dos SSRs, aliado à sua ampla distribuição no genoma, aumenta a sensibilidade na identificação de eventos de cruzamento e na avaliação da diversidade genética em populações, contribuindo para a seleção de genótipos com maior vigor e adaptabilidade (Gupta & Varshney, 2000). No contexto do cajueiro anão precoce, onde a manutenção da variabilidade genética é essencial para evitar os efeitos deletérios da endogamia, a aplicação de SSRs permite uma detecção mais rápida e precisa da endogamia, facilitando intervenções oportunas para garantir a sustentabilidade genética das populações de melhoramento (Zane *et al.*, 2002).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Os estudos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular (Extração de DNA) na Embrapa Agroindústria Tropical, Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, e no Laboratório de Genética Vegetal (Amplificação e Genotipagem) na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB Parque Estação Biológica, Brasília, Distrito Federal.

#### **3.1 Material Utilizado**

Este trabalho foi realizado a partir de um experimento de teste de progênies de meios-irmãos de cajueiro anão precoce, integrante do programa de melhoramento genético do cajueiro da Empresa de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) no Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical (CNPAT). Todo o material vegetal é

proveniente do Campo Experimental de Pacajus, pertencente à Embrapa Agroindústria Tropical, litoral leste do estado do Ceará, distante 55 km de Fortaleza. As coordenadas geográficas são 4° 10' S e 38° 27' W, com altitude de 60 metros acima do nível do mar. O solo da área experimental é do tipo Podzólico Vermelho Amarelo Tb eutrófico A fraco, com textura arenosa/média e pH = 6,0.

O experimento foi instalado em março de 2007 no Campo Experimental de Pacajus, localizado no estado do Ceará (Figura 6). As progênies foram selecionadas entre os genótipos elites dos experimentos de progênies já existentes no Campo de Pacajus e dos clones comerciais de cajueiro-anão precoce. Foram coletadas sementes de cada genótipo para a formação de progênies de polinização livre (progênies meias-irmãs). O ensaio é composto por 6 tratamentos (Tabela 2), distribuídos em delineamento experimental de blocos casualizados, com três repetições, 8 plantas por parcela, com bordadura externa envolvendo todo o experimento e espaçamento de 8 m x 6 m, totalizando 24 plantas por tratamento e suas respectivas matrizes, totalizando 150 genótipos utilizados. Essas plantas atendem aos atributos de porte baixo, castanha de tamanho grande (peso acima de 10 g), alta produção e resistência ao mofo preto e antracnose



**Figura 6** - Ensaio de Progênies de cajueiro anão precoce.

**Tabela 2.** Identificação dos materiais utilizados no experimento.

<b>Tratamentos (matrizes)</b>	<b>Família*</b>
1	AC 222-4
2	AC 276-1
3	AC 237-5
4	AC 214-4
5	AC 227-3
6	AC 262-3

\*AC: Planta matriz híbrida de cajueiro anão x comum

O material foi coletado no início da fase produtiva, durante a emissão de folhas novas. As folhas novas foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas resfriadas durante o transporte, em caixa de isopor com gelo, até o Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa, onde foram mantidas congeladas à temperatura de 20 °C negativos.

### 3.2 Extração de DNA

O protocolo adotado para extração de DNA foi baseado no método CTAB ajustado por Cavalcanti (2004) para *Anacardium occidentale* L., descrito a seguir.

Aproximadamente 0,8 g de folha fresca foi macerada em nitrogênio líquido utilizando um microtubo de 2 ml e um bastão. Em seguida adicionou-se 700 µL do tampão de extração, pré-aquecido à 65° C, composto dos seguintes reagentes: 100 mM de TRIS-HCL pH 8,0, 20 mM de EDTA (ethylenediaminetetracetate), 1,4 M de NaCl, 2% de CTAB (Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide) e 2% de PVP 40 (Polivinilpirrolidona). O material foi homogeneizado em vórtex e incubado em banho-maria por aproximadamente cinco minutos, invertendo os tubos duas vezes durante este período. Em seguida adicionou-se 700 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) em cada microtubo e realizou-se a homogeneização da solução com inversões suaves durante dois à três minutos. Posteriormente, as amostras foram levadas à microcentrífuga a 13.000 rpm por 10 minutos, nessa etapa a fase aquosa superior foi



transferida para um novo microtubo, onde realizou-se a precipitação pela adição de 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol frio ( $- 20^\circ \text{C}$ ), e, em seguida, efetuou-se uma nova centrifugação a 13.000 rpm, por 5 minutos. Ao final, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 450  $\mu\text{L}$  de Etanol Absoluto, seguindo-se uma nova centrifugação por 5 minutos a 13.000 rpm e, em seguida, removendo-se o etanol cuidadosamente. O precipitado formado foi seco em temperatura ambiente por 12 horas e, em seguida, ressuspensão em 50  $\mu\text{l}$  de TE.

Após as extrações, a qualidade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose 1% em TBE (90 mM Tris-ácido bórico/1mM EDTA), corado com brometo de etídio. Foi utilizado o marcador molecular 1Kb DNA ladder (Invitrogen). As amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 10 ng/ $\mu\text{L}$  e armazenadas em freezer a  $- 20^\circ \text{C}$ .

### 3.3 Amplificação do DNA

Foram realizados testes preliminares de amplificação com 47 pares de primers SSR utilizando as 6 matrizes. Desses primers, 6 apresentaram os melhores resultados quanto ao polimorfismo e nitidez de bandas. A partir dos resultados obtidos, estes primers foram selecionados para a avaliação dos 150 genótipos de caju. Os primers SSR selecionados estão apresentados na Tabela 3, estes primers foram desenvolvidos por LAMAS (dados ainda não publicados).

**Tabela 3.** Primers de marcadores microssatélites de *Anacardium occidentale* utilizados no experimento.

Primers	TA*
AOBR1	56° C
AOBR3	58° C
AOBR6	58° C
AOBR9	56° C
AOBR15	58° C
AOBR18	58° C

\* - temperatura de anelamento

As reações de PCR foram preparadas para um volume total de 13  $\mu\text{L}$ , utilizando-se 3  $\mu\text{L}$  de DNA juntamente com os seguintes reagentes:

	Quantidade para uma reação:
H <sub>2</sub> O milli Q	2,65 $\mu\text{L}$
Tampão 10x	1,3 $\mu\text{L}$
DNTP 2,5 mM	1,3 $\mu\text{L}$
BSA 2,5mg/ml	1,3 $\mu\text{L}$
Primer R/F 0,9 mM	3 $\mu\text{L}$
Enzima Taq DNA Polimerase 5U/ $\mu\text{L}$	0,2 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0,25 $\mu\text{L}$
Total	10 $\mu\text{L}$

As condições de PCR utilizadas foram: 5 minutos a 94 °C (desnaturação inicial), seguindo-se de 30 ciclos de desnaturação (94 °C por 1 minuto), temperatura de anelamento (56-58 °C, dependendo do iniciador, por 1 minuto) e extensão (72 °C por 1 minuto) seguindo-se de uma etapa de extensão final (72 °C por 7 minutos). As reações de amplificação foram realizadas em dois termocicladores, um termociclador da Perkin Elmer: GeneAmp PCR System 9600, e o outro, ABI Applied Biosystems 9700.

### 3.4 Resolução e Visualização dos Fragmentos Amplificados

Os produtos das reações de PCR foram separados e visualizados utilizando o sistema de gel desnaturante de poliacrilamida corado com nitrato de prata, de acordo com as recomendações de Creste *et al.* (2001).

A solução estoque de poliacrilamida utilizada é a de 40% (19:1), esta foi preparada da seguinte forma: 380 g de acrilamida e 20 g de bis-acrilamida em água destilada, para um volume final de 1 litro.

A solução matriz de poliacrilamida (5%), foi preparada com os seguintes reagentes:

- ✓ 200 mL de TBE 10x;
- ✓ 500 mL de acrilamida 40% (19:1);

- ✓ 1812 g de Uréia;
- ✓ 2680 µL de Temed (adicionado somente no final);
- ✓ Completar com H<sub>2</sub>O destilada p/ 4 litros. Esta solução fica armazenada em geladeira.

Para preparar as placas de vidro, o gel, a cuba vertical, a corrida das amostras na cuba, as soluções utilizadas para a resolução do gel e a visualização das bandas amplificadas, foram seguidos os seguintes passos:

- As placas foram lavadas com detergente neutro, água corrente, água destilada e deixadas na posição vertical para secar;
- Posteriormente, a placa maior foi limpa por duas vezes com etanol 95% esfregando-se lenços de papel, e a placa menor com água por duas vezes esfregando-se lenços de papel;
- Depois de seca à temperatura ambiente, a placa maior foi tratada com uma solução composta de 1,99 mL de etanol a 95%, 10 µL de ácido acético glacial e 6 µL de Bind Silane. O produto foi aplicado à placa e depois de 5 min o excesso foi removido com um lenço de papel umedecido em álcool a 95%;
- A placa menor foi tratada com 2 mL, aproximadamente, de uma solução anti-chuva utilizada em vidros de carros. Após 5 minutos o excesso foi removido com água destilada e lenços de papel;
- As placas foram montadas utilizando espaçadores de 0,5 mm;
- O gel de poliacrilamida foi aplicado nas placas; Este foi preparado utilizando 100 mL de solução matriz (5%) e 666 µL de persulfato de amônio a 10%;
- Em seguida, o pente com 98 poços foi posicionado e o aparato de placas foi mantido na posição horizontal por no mínimo duas horas para permitir a polimerização do gel;
- Após a polimerização, as placas foram montadas na cuba de eletroforese e os poços foram limpos com auxílio de uma pipeta automática;
- Antes da aplicação das amostras, o gel foi submetido a uma pré-corrída, sob potência constante de 90W, por 45 min ou até a placa atingir uma temperatura de aproximadamente 50° C;
- Antes da aplicação das amostras procedeu-se uma nova limpeza dos poços, através da injeção de tampão de corrida com auxílio de uma pipeta automática;
- Para a corrida é utilizado o TBE 1X;

- À reação de PCR com volume igual a 13  $\mu\text{L}$  foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de tampão de carregamento formamida (98% de formamida, 10mM EDTA, azul de bromofenol 1mg/mL e xileno cianol 1mg/mL);
- Em seguida, as amostras foram desnaturadas a 94°C por 5 minutos e transferidas para um recipiente com gelo, uma alíquota de 4  $\mu\text{L}$  foi aplicada em cada poço do gel. Foi utilizado o marcador de 10 pb;
- Após aplicação de todas as amostras, o sistema foi submetido à eletroforese sob potência constante de 90 W por 45 min;
- A coloração dos géis foi realizada com nitrato de prata;
- Após a separação das placas, a placa maior, onde o gel está aderido, foi imersa em dois litros de solução fixadora gelada (etanol 10% e ácido acético 1%) por 10 min, sob agitação orbital leve;
- Em seguida, o gel foi lavado em dois litros de água destilada por um minuto;
- Posteriormente, o gel foi imerso em dois litros de uma solução de oxidação (ácido nítrico 1,5%), em agitação leve por três minutos;
- Em seguida, o gel foi lavado em dois litros de água destilada por um minuto;
- Após esta lavagem, o gel foi posto na solução de nitrato de prata (2 g/L), por 20 minutos;
- Em seguida, foram feitas duas lavagens sucessivas em água destilada por 30 segundos, cada;
- Posteriormente, a revelação foi realizada pela imersão do gel em dois litros de solução gelada contendo 3% (p/v) de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) e 0,54ml/L de formaldeído a 37% (adicionado somente na hora do uso da solução). A placa foi agitada manualmente até o surgimento das bandas;
- Em seguida, o gel foi imerso em dois litros de solução “Stop” (ácido acético 10%) por cinco minutos para bloquear o processo de revelação;
- A placa foi novamente lavada em água destilada por um minuto;
- E armazenada na posição vertical em local arejado para secagem do gel.
- Após a secagem os géis foram foto documentados com auxílio de um scanner.

O programa ImageJ (desenvolvido por Wayne RASBAND do Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland) foi utilizado para estimar o tamanho dos alelos amplificado em termos de pares de base.

Foi construída uma planilha de dados com as informações referentes à presença das bandas em cada um dos indivíduos (Anexo 1). Para cada banda, nos respectivos primers, foram dados números de 1 a 3 para a sua identificação e para dados perdidos foi adicionado o número zero (Anexo 2).

### 3.5 Análise dos Dados

As análises do sistema de reprodução, com base nas frequências genotípicas obtidas da análise dos dados de amplificação por marcadores microsatélites, foram baseadas no modelo misto de reprodução (CLEGG, 1980; RITLAND & JAIN, 1981), através de estimativas de máxima verossimilhança (Ritland & El-Kassaby 1985, Ritland & Jain 1981) utilizando-se o programa “Multilocus MLTR” (Multilocus Mating System Program, Versão 3.4, revisado em novembro de 2009) (RITLAND, 2010). Os parâmetros estimados foram:

- 1) As frequências alélicas (diversidade genética) ;
- 2) A taxa populacional de cruzamento multiloco ( $t_m$ );
- 3) A taxa populacional de cruzamento uniloco ( $t_s$ );
- 4) A taxa de cruzamento entre aparentados ( $t_m - t_s$ );
- 5) A taxa por família de cruzamento multilocos (t) e autofecundação (s);

A taxa multiloco ( $t_m$ ) permite obter a taxa de indivíduos obtidos por cruzamento. A diferença positiva entre  $t_m$  e 1 ( $1 - t_m$ ) é a taxa de autofecundação (s) na população (RITLAND, 1990) e a diferença entre  $t_m$  e  $t_s$  ( $t_m - t_s$ ) é a taxa de cruzamento entre aparentados (SHAW & ALLARD 1982, RITLAND & EL KASSABY 1985, RITLAND 1990). Com a taxa unilocos ( $t_s$ ) obtemos os indivíduos de cruzamentos aleatórios, sendo estes aparentados no grau de meio-irmãos.

Todos estes parâmetros são utilizados simultaneamente durante a rotina de estimação através da solução de equações de probabilidade, envolvendo o método de máxima verossimilhança, utilizando o algoritmo Expectation-Maximization (EM). A descrição do processo de estimação de máxima verossimilhança das estimativas dos

parâmetros do sistema de cruzamento são apresentados por Ritland e El-Kassaby (1985). Este processo de estimação é empregado quando os genótipos maternos são conhecidos e a frequências genóticas no conjunto de pólen são desconhecidas (LOPES, 2002).

O modelo assume que as plântulas resultam de um mistura de cruzamentos aleatórios e autofecundações, sendo considerado que o conjunto de pólen é distribuído de forma homogênea para o cruzamento com todos os genótipos maternos, que os alelos de diferentes locos segregam independentemente, que os locos não são afetados pela seleção ou mutação entre o tempo de cruzamento e análise, e que os locos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ou que a segregação dos alelos em plantas maternas heterozigotas é estritamente mendeliana, em uma razão de 1:1 tanto para produção de pólen como de óvulo (RITLAND & JAIN, 1981).

O desvio-padrão (*DP*) das estimativas dos parâmetros foi obtido por meio de “*bootstraps*” utilizando-se 1.000 reamostragens onde a unidade de amostragem para as estimativas das taxas de cruzamento populacional e individual foram as plantas das progênies e dentro das progênies, respectivamente. O desvio-padrão foi usado para calcular o erro-padrão das estimativas médias a 95% de probabilidade (Ritland, 1997).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os seis *primers* utilizados amplificaram um total de 16 alelos nas seis famílias avaliadas. O tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb) variou de 138 a 225 pares de bases, e o número de alelos amplificados por primer foi de dois (primers AOB1 e AOB9) e três (primers AOB1, AOB3, AOB15 e AOB18) (Anexo 1 Tabela 8), com uma média de 2,66 alelos por loco (Tabela 4). Esta média de alelos por loco de 2,66, está abaixo do esperado para espécies alógamas, onde geralmente se espera uma maior diversidade genética devido à natureza cruzada de seu sistema reprodutivo (Young *et al.*, 1996).

Para estudos do sistema de reprodução, Ritland (2002) recomenda trabalhar com pelo menos 200 amostras e quatro a cinco locos polimórficos. As estimativas de taxa de cruzamento para estrutura de famílias vêm sendo realizadas com poucos microsatélites, geralmente entre quatro e oito (ABDEL-GHANDI *et al.*, 2004; KARASAWA *et al.*, 2007). A quantidade de amostras utilizadas no presente trabalho é

25% menor do que a ideal, mas apresenta a vantagem de ter sido analisada para 6 locos microssatélites.

**Tabela 4.** Primers de microssatélites (SSR), quantidade de alelos por primers e tamanho dos alelos por pares de base. Dados obtidos a partir da amplificação do DNA das 6 famílias com a utilização dos 6 primers SSR. Estes resultados foram visualizados utilizando o sistema de gel desnaturante de poliacrilamida corado com nitrato de prata.

Primers	Número de Alelos	Tamanho em pb
AOBR1	2	178
		168
AOBR3	3	175
		160
		152
AOBR6	3	194
		185
		175
AOBR9	2	225
		210
AOBR15	3	155
		145
		138
AOBR18	3	160
		155
		139
Nº Mínimo	1	138
Nº Máximo	3	225
MÉDIA	2,66	

A baixa diversidade alélica observada na cultura do cajueiro, com uma média de 2,66 alelos por loco, pode ser atribuída à combinação de deriva genética, seleção artificial e fluxo gênico limitado. A deriva genética, particularmente em populações pequenas ou isoladas, pode levar à perda de alelos e à fixação de outros, reduzindo a diversidade genética (YOUNG *et al.*, 1996). Além disso, a seleção artificial em populações cultivadas, como o cajueiro, pode rapidamente diminuir a variabilidade genética ao favorecer alelos específicos que conferem características desejáveis (O'MALLEY & BAWA, 1987). A amostragem reduzida e o fluxo gênico limitado, devido ao isolamento ou dispersão restrita de pólen e sementes, também podem ter contribuído para essa baixa diversidade (FRANKHAM, 2005). Esses fatores sugerem que, apesar de ser uma planta alógama, o cajueiro cultivado apresenta uma variabilidade

genética reduzida, possivelmente devido às práticas de cultivo e à estrutura populacional.

As frequências alélicas variaram na população, desde frequências relativamente alta, como o alelo 1 do primer AOBR1 com 86%, até frequências muito baixas, como no alelo 2 do primer AOBR15 com apenas 14% (Tabela 5).

**Tabela 5.** Frequências alélicas e tamanho das amostras (n) para cada um dos seis locos SSR de seis famílias de progênies meio-irmãs de cajueiro anão precoce.

Primers	Alelos	Frequência Alélica (Erro padrão)
AOBR1	1	0.860 (0.024)
	2	0.140 (0.024)
	n	144
AOBR3	1	0.452 (0.115)
	3	0.148 (0.029)
	2	0.400 (0.101)
	n	139
AOBR6	2	0.556 (0.113)
	3	0.406 (0.125)
	1	0.038 (0.043)
	n	139
AOBR9	1	0.788 (0.050)
	2	0.212 (0.050)
	n	141
AOBR15	1	0.589 (0.106)
	3	0.397 (0.103)
	2	0.014 (0.016)
	n	139
AOBR18	1	0.668 (0.111)
	3	0.210 (0.078)
	2	0.122 (0.054)
	n	143

Os alelos nº 2 dos primers AOBR1 e AOBR18 são encontrados em apenas uma das progênies maternas, a MT1 e a MT6, respectivamente. Estes alelos possuem frequências muito baixas na população 0,140(0,024) para o alelo 2 do MT1 e 0,122(0,054) para o alelo 2 do MT6.



A presença do alelo 2 do primer AOB15 foi exclusiva nas progênies e com uma frequência bastante baixa, 0,014 (0,016). Isto pode ter ocorrido por dois fatores: efeito de deriva genética - variação amostral nos indivíduos adultos, ou seja, os seis indivíduos adultos amostrados não foram suficientes para representar a frequência alélica de toda a população e devido ao fluxo gênico advindo de outros indivíduos.

A frequência alélica observada varia significativamente entre os primers. Por exemplo, o primer AOB1 apresenta uma alta frequência alélica para o alelo 1 (0,860), enquanto o alelo 2 está presente em apenas 14% dos indivíduos (0,140). Este padrão se repete para outros primers, como AOB9, onde o alelo 1 tem uma frequência de 0,788 e o alelo 2, 0,212. A baixa frequência alélica observada em alguns alelos, como no alelo 2 do primer AOB15 (0,014), sugere a presença de deriva genética ou de seleção, que pode estar influenciando a variabilidade genética na população estudada (FRANKHAM, 2005). Além disso, a seleção artificial, comum em plantas cultivadas como o cajueiro, pode ter levado à fixação de alelos específicos, resultando em uma menor diversidade genética (O'MALLEY & BAWA, 1987). Outro fator a ser considerado é a amostragem reduzida utilizada no estudo, que, conforme destacado por Ritland (2002), deveria incluir um maior número de amostras para melhor representar a variabilidade genética da população.

Deriva genética ou de seleção podem ser indicadas por oscilações nas frequências alélicas, perdas e fixação de alelos. As oscilações se desenvolvem por meio de processos aleatórios, quando não existem mecanismos de seleção natural. No caso da seleção, o efeito poderia ser tanto de natureza direta, como de natureza indireta. A análise das frequências alélicas é de grande importância, pois pode refletir melhor os efeitos estocásticos do que a maioria dos parâmetros utilizados no estudo de genética de populações, uma vez que tais parâmetros não refletem diretamente frequências alélicas eventualmente muito baixas (OLIVEIRA, 2002).

Os resultados obtidos para  $t_m$  em nível de família,  $t_m$  em nível de população,  $t_{\text{smédio}}$  em nível de população,  $t_m - t_s$  e seus respectivos desvios padrão em parênteses, são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Estimativas de máxima verossimilhança da taxa de cruzamento do cajueiro com base em multilocos ( $t_m$ ) em nível de população e de família, e uniloco média ( $t_{s\text{média}}$ ) obtidas pelo método auxiliar de maximização da esperança.

Parâmetros	Estimativas
$t_m$ em nível de família	
MT1	0,193 (0,016)
MT2	0,193 (0,016)
MT3	0,413 (0,090)
MT4	0,912 (0,067)
MT5	0,980 (0,017)
MT6	0,856 (0,018)
$t_m$ em nível de população	0,518 (0,133)
$s$	0,482
$t_s$ médio em nível de população	0,464 (0,138)
$t_m - t_s$	0,054 (0,023)

( ) = erro padrão da média a 95% de probabilidade.

Com as seis progênies utilizadas foi obtida a estimativa de  $t_m$  em nível de população (Tabela 6); A média estimada de  $t_m$  foi de 0,518 (0,133), a diferença entre  $t_m$  e  $t_s$  foi 0,054 e a taxa de autofecundação ( $s$ ) foi 0,482. Assim, neste ciclo reprodutivo, 51,8% das plântulas foram geradas por cruzamentos, sendo 46,4% entre indivíduos não aparentados, 5,4% entre aparentados (irmãos completos em famílias de fecundação cruzada) e 48,2% por autofecundação. Com estes dados podemos concluir que *Anacardium occidentale* L. é uma planta de reprodução mista, com predominância para a alogamia. Frutíferas em geral possuem alta tendência à alogamia, como demonstrado por Lopes *et al.* (2002) em aceroleira (*Malpighia emarginata*), Telles *et al.* (2003) em *Eugenia dysenterica* e Ferreira *et al.* (2007) em maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis).

As estimativas da taxa de cruzamento multiloco ( $t_m$ ) variaram entre as famílias de cajueiro, com valores tão baixos quanto 0,193 em MT1 e MT2, e tão altos quanto 0,980 em MT5. Isso demonstra uma variação significativa nas taxas de cruzamento dentro da população, sugerindo a ocorrência de tanto cruzamento alogâmico quanto de autofecundação. A baixa  $t_m$  em certas famílias indica a presença de altos níveis de autofecundação, o que pode contribuir para a redução da diversidade genética e aumentar a homozigidade, conforme discutido por Charlesworth e Willis (2009), que ressaltam que altas taxas de autofecundação podem levar a uma maior expressão de alelos deletérios.

A diferença entre  $t_m$  e  $t_s$  média ( $t_m - t_s$  média = 0,054) sugere que há uma leve tendência à endogamia dentro da população, possivelmente devido à estrutura espacial da população ou à limitação de polinizadores. Barrett e Harder (1996) relatam que a endogamia pode ser exacerbada em populações com dispersão limitada de pólen, levando a uma maior homogeneidade genética dentro das subpopulações.

De acordo com Shaw & Allard (1982), a diferença positiva indica a ocorrência de cruzamento correlacionado (endogamia biparental), pois, quando ocorre endogamia decorrente do cruzamento entre parentes em adição à autofecundação, espera-se que as estimativas multilocos de  $t$  sejam maiores do que as estimativas uniloco. Segundo Robinson (1998), a diferença entre  $t_m$  e  $t_{smédio}$  também pode ser decorrente da heterogeneidade nas frequências alélicas durante o período de florescimento (resultantes da defasagem no florescimento ou das diferenças em fecundidade entre as plantas). Portanto, a diferença significativa encontrada revela que a frequência alélica no conjunto de pólen que contribuiu na formação dos novos zigotos não se distribuiu uniformemente sobre os genitores femininos. De fato, as matrizes possuem as mesmas localizações e encontram-se dentro de diferentes populações ou experimentos no Campo Experimental de Pacajus.

Esses resultados refletem a complexidade do sistema de reprodução do cajueiro e enfatizam a necessidade de conservação genética para preservar a variabilidade dentro da espécie. A redução da diversidade genética, aliada à variação nas taxas de cruzamento, aponta para a importância de práticas de manejo que promovam o fluxo gênico entre subpopulações e a manutenção de altos níveis de heterozigosidade, conforme sugerido por Frankel *et al.* (1995).

As estimativas de máxima verossimilhança da taxa de cruzamento das famílias, com base em multilocos, obtidas pelo método EM variaram de 0,193 a 0,980 (Tabela 7). Esta discrepância nas taxas de cruzamentos individuais pode estar associada também ao assincronismo na floração masculina e feminina, ou ao local de origem da planta matriz, ou ainda devido ao comportamento dos polinizadores. Barrett e Harder (1996) destacam que em populações onde ocorre cruzamento misto, a estrutura genética pode ser influenciada pela densidade populacional e pela presença de polinizadores, o que pode levar a uma diversidade genética variável.

**Tabela 7.** Resultados dos alelos das progênies maternas e os valores da taxa de cruzamento de suas respectivas progênies (*t*).

Progenitor Materno	Genótipos												% Cruzamentos da Progênie ( <i>t</i> )	% Autofecundação da Progênie ( <i>s</i> )
	AOBR1		AOBR3		AOBR6		AOBR9		AOBR15		AOBR18			
	P01	P01	P03	P03	P06	P06	P09	P09	P15	P15	P18	P18		
MT1	1	2	1	1	2	2	1	1	1	1	1	3	0,193 (0,016)	0,807
MT2	1	1	1	3	3	3	1	1	1	3	1	3	0,193 (0,016)	0,807
MT3	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	0,413 (0,090)	0,587
MT4	1	1	1	2	2	3	1	1	1	3	1	3	0,912 (0,067)	0,088
MT5	1	1	1	2	2	3	1	2	1	1	1	3	0,980 (0,017)	0,020
MT6	1	1	1	1	2	2	1	1	1	3	2	3	0,856 (0,018)	0,144

As progênies que apresentaram um baixo valor de *t*, podem ter florescido no início ou no fim do pico da florada masculina da população, fase em que provavelmente havia pouco ou nenhum pólen disponível para os cruzamentos; podem estar em local isolado ou ser de campos experimentais contendo plantas clonadas; fatos que possivelmente possibilitaram a autofecundação.

A análise dos genótipos mostra que a distribuição dos alelos nas progênies não é uniforme, refletindo a estrutura genética heterogênea dentro da população. Essa heterogeneidade pode ser um reflexo do histórico de cruzamento da população, onde a mistura de indivíduos autofecundados e cruzados gera uma variabilidade alélica limitada. De acordo com Frankel *et al.* (1995), populações com alta taxa de autofecundação apresentam um maior risco de perda de diversidade genética, o que pode comprometer a adaptabilidade da espécie a mudanças ambientais.

Portanto, os resultados indicam que, embora algumas famílias de cajueiro mantenham altos níveis de cruzamento, a prevalência de autofecundação em outras pode estar contribuindo para a redução da variabilidade genética na população

## 5 CONCLUSÕES

1. As análises indicaram uma baixa diversidade genética nas progênies meio-irmãs de cajueiro anão precoce, com uma média de 2,66 alelos por loco, sugerindo que a população apresenta variabilidade genética limitada, possivelmente devido à deriva genética, seleção artificial e fluxo gênico restrito.

2. As estimativas da taxa de cruzamento revelaram que o cajueiro anão precoce possui um sistema de reprodução misto, com predominância de cruzamento alogâmico, mas com uma significativa ocorrência de autofecundação, refletindo a heterogeneidade genética dentro da população.

3. A heterogeneidade nas frequências alélicas e nas taxas de cruzamento dentro da população estudada indica uma estrutura genética complexa, onde tanto a autofecundação quanto o cruzamento alogâmico contribuem para a composição genética das progênies. Essa variabilidade reflete a possível influência de fatores como a localização das plantas matriz e o comportamento dos polinizadores.

4. Famílias com baixas taxas de cruzamento ( $t_m$ ) podem estar mais sujeitas à autofecundação, o que contribui para uma maior homozigosidade e, potencialmente, para a redução da adaptabilidade da espécie a mudanças ambientais. A autofecundação predominante em certas famílias pode estar associada a fatores como o isolamento espacial ou temporal das plantas, o que limita o fluxo de pólen entre diferentes indivíduos.

5. Os marcadores microssatélites (SSR) mostraram-se eficientes na distinção entre plantas autofecundadas e híbridas em estágio juvenil (viveiro). Assim, os SSR são indicados como uma ferramenta valiosa na seleção precoce de plantas, contribuindo para a melhoria genética e conservação da espécie.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACQUAAH, G. **Principles of plant genetics and breeding**. 2nd Edition, John Wiley & Sons. 2007. 740p.
- ALLARD, R. W. **Princípios de melhoramento genético de plantas**. São Paulo: E. Blücher, 1971. 381 p.
- ALZATE-MARIN, A. L., CERVIGNI, G. D. L., MOREIRA, M. A., & BARROS, E. G. **Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja**. 2005. *Fitopatologia Brasileira*, 30(4), 333–342.
- ARAÚJO, J.P.P; SILVA, V.V (Orgs). **Cajucultura: modernas técnicas de produção**. Fortaleza: Embrapa, CNPAT, 1995, 292p.
- BAILEY, L. H. **The standard cyclopedia of horticulture**. New York MacMillan. 1942. 1200p.
- BARRETT, S. C. H., & HARDER, L. D. **Ecology and evolution of plant mating**. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(2), 73-79. 1996.
- BARROS, L.M.; ARAÚJO, F.E.; ALMEIDA, J.I.L.; TEIXEIRA, L.M.S. **A cultura do Cajueiro Anão**. Fortaleza, EPACE. 1984. 67p. (EPACE, Documentos, 3).
- BARROS, L.M. Melhoramento. In: LIMA, V.P.M.S. (Org.). **A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: BNB/ETENE, 1988. p. 321-356 (BNB/ETENE, Estudos Econômicos e Sociais, 35).
- BARROS, L. M.; PIMENTEL, C.R.M.; CORREA, M.P.F.; MESQUITA, A.L.M. **Recomendações técnicas para a cultura do cajueiro anão precoce**. Fortaleza, EMBRAPA/CNPAT, 1993, 65p. (EMBRAPA, Circular Técnica, 01).
- BARROS, L.M. e CRISÓSTOMO, J.R. Melhoramento Genético do Cajueiro. In: ARAÚJO, J.P.P. e SILVA, V.V. **Cajucultura: Modernas Técnicas de Produção**. EMBRAPA\CNPAT, Fortaleza, 1995. p.73-96.
- BARROS, L.M.; PAIVA, J.R.; CAVALCANTI, J.J.V.; ARAÚJO, J.P.P. Cajueiro. In: BRUCKNER, C.H. (Ed.). **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa: UFV, 2002a. p. 159-176.
- BARROS, L.M.; PAIVA, J.R.; CAVALCANTI, J.J.V.; CRISÓSTOMO, J.R. **Clone BRS 265 Cajueiro-Anão Precoce (Cultivar PACAJUS)**. Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza: agosto, 2005.
- BAWA, K.S. **Breeding systems of tree species of a lowland tropical community**. *Evolution*, v.28, p.85-92, 1974.

BUSO, G.S.C.P.; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.V. Marcadores Microssatélites em Espécies Vegetais. **Rev. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Ed. 30. Jan – Jun. 2003. p 46-50.

CAVALCANTI, J. J.V.; PINTO, C. A. B. P.; CRISOSTOMO, J. R.; FERREIRA, D. F. Análise dialélica para avaliação de híbridos interpopulacionais de cajueiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, n.8, p.1567-1575. 2000.

CAVALCANTI, J.J.V.; WILKINSON, E.M.J. **the first genetic maps of cashew (*Anacardium occidentale L.*)** *Euphytica*. (2007). 157:131-143, 2007.

CAVALCANTI, J.J.V.; BARROS, L.M. **Avanços, desafios, e novas estratégias do melhoramento genético do cajueiro no Brasil**. In: I Simpósio Nordeste de Genética e Melhoramento de Plantas. Fortaleza: EMBRAPA/CNPAT, 2009. 210P.

COMSTOCK, R.E.; ROBINSON, H.F.; HARVEY, P.H. A breeding procedure designed to make maximum use of both general and specific combining ability. **Agronomy Journal**, v. 41, p 306-367. 1949.

CHARLESWORTH, D., & WILLIS, J. H. **The genetics of inbreeding depression**. *Nature Reviews Genetics*, 10(11), 783-796. 2009.

CLEGG, M.T. 1980. **Measuring plant mating systems**. *Bioscience* 30:814-818.

CRESTE, S.; TULMAN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. **Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining**. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.19, n.4, p.299-306. 2001.

CRESTE, S., TULMANN NETO, A., DE OLIVEIRA SILVA, S. **ET AL. Genetic characterization of banana cultivars (*Musa spp.*) from Brazil using microsatellite markers**. *Euphytica* 132, 259–268. 2003.

CRISÓSTOMO, J.R.; BARROS, L.M.; PAIVA, J.R.; CAVALCANTI, J.J.V.; **Melhoramento genético do cajueiro. Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro. Melhoramento genético do cajueiro**. Embrapa, 1999. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/catalogo/livrorg/cajumelhoramento.pdf> Acesso em: 23 de jun. 2010.

CRISÓSTOMO, J.R.; CAVALCANTI, J.J.V.; BARROS, L.M.; ALVES, R.E.; FREITAS, J.G.; OLIVEIRA, J.N. Melhoramento do cajueiro-anão-precoce: avaliação da qualidade do pedúnculo e a heterose dos seus híbridos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 477-480, 2002.

DAMODARAN, V. K. **Hybrid vigour in cashew ( *Anarcadium accidentale L.*)**. *Agric. Pes. Journal Karala*, v13, p. 195 – 196. 1975.

DIAS, F.T.C. **Utilização de técnicas multivariadas e moleculares na caracterização e seleção de genótipos de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce**. Fortaleza, 2009. 98p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Ceará.

ELLSTRAND, N.C. Gene flow among seed plant populations. **New forests**. v.6, p 241-256, 1992.

ESPINDOLA, S. M. C. G. **Seleção Assistida por Marcadores Moleculares em Soja para Resistência ao Fitonematóide *Heterodera glycines* Raça 3**. 2004. 60f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2004.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <<<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>>. 26 de junho de 2010.

FERRÃO, J.E.M; **O Cajueiro**. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, 1995. 299p.

FERRÃO, J.E.M. **A aventura das plantas e os descobrimentos portugueses**. 2ª ed. Fundação Berardo, 1992. p. 85-90.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3º ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998, 220p.

FERREIRA, M. A. J. da F. **Utilização das técnicas de marcadores moleculares na genética de populações, na genética quantitativa e no melhoramento de plantas**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2003. 63p. (Embrapa Roraima. Documentos, 1).

FERREIRA, T. G. T ; OLIVEIRA, C. A. ; JUNQUEIRA, N. ; FIDELIS, M. ; ZUCCHI, M.I. ; VIERA, M.L.C. . **Estimativa da Taxa de Cruzamento de *Passiflora alata* Curtis Utilizando Marcadores Moleculares**. In: 53 Congresso Brasileiro de Genética, 2007, Águas de Lindóia - SP. 53 Congresso Brasileiro de Genética. Ribeira Preto : Sociedade Brasileira de Genética, 2007.

FRANKEL, O. H., BROWN, A. H. D., & BURDON, J. J. ***The conservation of plant biodiversity***. Cambridge University Press. 1995.

FRANKHAM, R. **Genetics and extinction**. *Biological Conservation*, 126(2), 131-140. 2005.

GUIMARÃES, C.T.; MAGALHÃES, J.V.; LANZA, M.A., SCHUSTER, I. **Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético**. 2009.

GUPTA, P. K., & VARSHNEY, R. K. **The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding**. *Plant Breeding*, 118(5), 369-390. 2000.

HAMRICK, J.L.. **The distribution of genetic variation within and among natural plant population**. In Genetics and conservation (C.M. Schone-Wald-Cox, S.H. Chambers, B. MacByde & L. Thomas, eds.). Benjamin Cummings Publishing Company, Menlo Park, p.335-348. 1983.



HAMRICK, J.L. & LOVELESS, M.D.. **The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations.** *In* Frugivores and seed dispersal (A. Estrada & T.H. Fleming, eds.). Junk Publishers, New York, p.17-59. 1986.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. **Allozyme diversity in plant species.** *In* **Plant population genetics, breeding and genetic resources** (A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler & B.S. Weir, eds). Sinauer, Sunderland, p.43-63. 1989.

HELENTJARIS, T., SLOCUM, M., WRIGHT, S., SCHAEFER, A. & NIENHUIS J. **Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms.** *Theoretical and Applied Genetics* 72:761-769. 1986.

HOKANSON, S. C., SZEWC-MCFADDEN, A. K., LAMBOY, W. F., & MCFERSON, J. R.. **Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus × domestica* Borkh. core subset collection.** 1998. *Theoretical and Applied Genetics*, 97(5-6), 671-683.

IBGE, **Levantamento sistemático da produção agrícola (LSPA).** Disponível em:<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf>>. Acesso em 04 de junho 2010.

LANDE, R; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. **Genetics**, v. 124, p 743-756. 1990.

LANZA BIOTECNOLOGIA, **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v.21, n.204,p.1-128, 2000.

LI, C. D.; FATOKUN, C. A.; UBI, B.; SINGH, B. B.; SCOLES, G. J. Determining Genetic Similarities and Relationships among Cowpea Breeding Lines and Cultivars by Microsatellite Markers. **Crop Science**, v.41, p.189-197, 2001.

LIMA, V. P. M. S. **Origem e distribuição geográfica.** *In*: LIMA, V. P. M. S. A cultura do cajueiro no nordeste do Brasil. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 1988. p. 3-13.

LOPES, Ricardo; BRUCKNER, Cláudio Horst; LOPES, Maria Teresa Gomes. Estimação da taxa de cruzamento da aceroleira com base em dados isoenzimáticos. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 37, n. 3, Mar. 2002.

MAGAHÃES, E. Fruticultura Tropical - O cajueiro. **Boletim de Agricultura**, São Paulo Série 14, no2, 1913. p 107-22.

MANOJ, P. S.; GEORGE. T. E. **Heterosis in cashew ( *Anarcadium occidentale* L.).** *Cashew*, v.7 n.3, p.7-9. 1993.

MILACH, S.C.K. Mapeamento molecular de características de importância agronômica. *In*: MILACH, S.C.K. (Ed.) **Marcadores moleculares em plantas.** Porto Alegre, UFRGS, p. 67-73, 1998.

MITCHELL, J.D.; MORI, S.A. The cashew and its relatives (*Anacardium: Anacardiaceae*). **Memoirs Of The New York Botanical Garden**, v. 42, 1987, 76p.

MONTENEGRO, A.A.T.; CARBAJAL, A.C.R.; MESQUITAL, A.L.M.; AQUINO A.L.R.; FREIRE, F.C.O.; PAIVA J.R.; **Cultivo do cajueiro**, Embrapa Agroindústria Tropical, Sistemas de Produção, 1 ISSN 1678-8702 , Versão eletrônica, Jan/2003.

NYBOM, H., & BARTISH, I. V. **Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants.** *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 3(2), 93-114. 2000.

OLIVEIRA, V.H.; MONTENEGRO, A.A.T.; CARBAJAL, A.C.R.; MESQUITA, A.L.M.; AQUINO, A.R.L.; FREIRE, F.C.O.; OLIVEIRA, F.N.S.; ARAÚJO FILHO, G.C.; PAIVA, J.R.; PAZ, J. S.; PARENTE, J.I.G.; MOSCA, J.L.; BARROS, L. M.; CRISOSTOMO, L.A.; PESSOA, P.F.A.P.; SILVEIRA, S.S. **Cultivo do cajueiro anão precoce.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2002 (Sistemas de Produção 1).

OLIVEIRA, A.F., CARVALHO, D. & ROSADO, S.C.S. **Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas.** *Revista Brasileira de Botânica* V.25, n.3 p.331-338. Set 2002.

O'MALLEY, D. M., & BAWA, K. S. **Mating system of a tropical rain forest tree species.** *American Journal of Botany*, 74(8), 1143-1149. 1987.

PAIVA, J.R.; BARROS, L.M.; CRISÓSTOMO, J.R.; ARAÚJO, J.P.P.; ROSSETTI, A.G.; CAVALCANTE, J.J.V.; FELIPE, E.M. Depressão por endogamia em progênes de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.) var. *nanum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, n.4, p.425-431. 1998.

PAIVA, J.R.; BARROS, L.M. **Clones de cajueiro-obtenção, características e perspectivas.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2004. 26p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 82).

POWELL, W., MACHRAY, G. C., & PROVAN, J. **Polymorphism revealed by simple sequence repeats.** *Trends in Plant Science*, 1(7), 215-222. 1996.

RASBAND, W. **Image J documentation.** Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/index.html>>. Acessado em mar 2010.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and application in plant breeding. **Euphytica**. v. 128, p. 9-17, 2002.

RESENDE, M.D.V. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 975p.

RIBAS, L.A. Diversidade genética e sistema de cruzamento em populações naturais de duas espécies pioneiras arbóreas. **Divisão de Biblioteca e Documentação – ESALQ/USP.** Tese, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2003. 102 p.

RITLAND, K.; EL-KASSABY, Y.A. **The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas fir as shown by an efficient multilocus model.** *Theoretical Applied Genetics*, v.71, n.3, p.375-384, 1985.

RITLAND, K. **Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*.** *Evolution*, Lawrence, v. 43, p. 848-859, 1989.

RITLAND, K. **Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci.** *Heredity*, 88(4), 221-228. 2002.

RITLAND, K. **Multilocus mating system program MLTR.** University of British Columbia. Free program distributed by the authors from. Disponível em: < <http://genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs.html>>. Acesso em: Abril de 2010.

ROBINSON, I. P. **Aloenzimas na genética de populações de plantas.** In: ALFENAS, A. C. (Ed.). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa, MG: UFV, 1998. p. 329-368.

ROBERTSON, H. **Anacardium occidentale (Cashew).** 2002. Iziko Museums of Cape Town, South African. [www.museums.org.za/bio/contributors.htm](http://www.museums.org.za/bio/contributors.htm). Acesso em março de 2003.

ROSSETTI, A.G.; AQUINO, A.R.L. Influência do tipo de ramo sobre o crescimento e produção do cajueiro-anão-precoce de copa substituída. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, 2002.

RUMIN, G. C. R. **Análise da interação genótipo x ambiente assistida por marcadores moleculares em milho (*Zea mays* L.).** Piracicaba, 2005. 230p, Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo.

SANTOS, F.H.C. **Variabilidade físico-química em pedúnculos de cajueiro anão precoce numa população de retrocruzamento 1 (RC1).** 2006. 48f. Monografia (Graduação) Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2006.

SATANDER, C; ALBERTIN, W. *Anacardium excelsum*, espécie forestal de los trópicos americanos. **Turrialba**, v. 30, n. 1, p. 17-23, 1980.

SEFC, K. M., LOPES, M. S., LEFORT, F., BOTTA, R., ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A., IBÁÑEZ, J., ... & GLÖSSL, J. **Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars.** *Theoretical and Applied Genetics*, 100(3-4), 498-505. 2000.

SHAW, D. V.; ALLARD, R. W. Estimation of outcrossing rates in Douglas-fir using isozyme markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 62, p. 113-120, 1982

SOUSA JUNIOR, C. L. Melhoria de espécies alógamas. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C.; (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento**: plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.159-2001.

SOUSA, T. R. M. **Estimativas de parâmetros genéticos e fenótipos no cajueiro anão precoce para antracnose e mofo preto**. 2009. 53f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2009.

SOUZA, Lina M.F.I.; KAGEYAMA, Paulo Y.; SEBBENN, Alexandre M.. Sistema de reprodução em população natural de *Chorisia speciosa* A. St.-Hil. (Bombacaceae). **Rev. bras. Bot.**, São Paulo, v. 26, n. 1, Mar. 2003.

SUN, M.; RITLAND, K. Mating system of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*), a successful colonizer in north America. **Heredity**, v. 80, p. 225-232, 1998.

TELLES, M.P.D.; COELHO, A.S.G.; CHAVES, L.J. Genetic diversity and population structure of *Eugenia dysenterica* DC. ("cagaiteira" - Myrtaceae) in Central Brazil: Spatial analysis and implications for conservation and management. *Conservation Genetics*, v. 4, p. 685-695. (2003).

TODA FRUTA, 2005. **Espécies potenciais do gênero Anacardium no Cerrado Goiano**. Disponível: <[http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra\\_conteudo.asp?conteudo=10319#](http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=10319#)> Acesso em 18 de junho de 2010.

VAVILOV, N.I. **The Origin, Variation, Immunity and Breeding of Cultivated Plants**. The Ronald Press Company, New York, 1951, 364p.

YOUNG, A. G., BOYLE, T. J., & BROWN, A. H. D. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(10), 413-418. 1996.

ZANE, L., BARGELLONI, L., & PATARNELLO, T. **Strategies for microsatellite isolation: a review**. *Molecular Ecology*, 11(1), 1-16. 2002.

ZEVEN, A.C. e ZHUKOVSKY, P.M. **Dictionary of cultivated plants and their centres of diversity - Excluding ornamentals forest trees and lower plants**. Wageningen - Centre for Agricultural Publishing and Documentation. 1975. 145p.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, 20:176-183, 1994.

ZIMMER, P. D.; OLIVEIRA, A. C.; MALONE, G. **Ferramentas da biotecnologia**: no melhoramento genético vegetal. Pelotas: UFPEL, 2005. 158p.











## ANEXO 1 – Continuação...

Primers		Mae T5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
AOBR1	178																h			h						
	168	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
AOBR3	175							h			h				h											
	160	h	h	h	h	h	h	h	h			h	h	h	h	h		h				h			h	
	152	h		h	h		h		h	h	h	h	h	h		h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	
AOBR6	194	h	h	h	h		h	h	h	h	h	h	h	h	h	h		h	h		h	h	h		h	h
	185	h	h			h	h	h	h		h	h		h		h	h	h		h		h		h	h	h
	175					h																				
AOBR9	225	h		h		h	h	h	h	h	h	h		h	h	h	h		h	h	h			h	h	h
	210	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h		h	h	h	h	h		h	h		h	h
AOBR15	155		h			h	h	h			h	h		h	h				h	h	h		h	h	h	h
	145																									
	138	h	h	h	h	h			h	h	h	h	h		h	h	h	h	h	h	h	h		h		h
AOBR18	160	h	h	h		h	h	h	h	h	h	h	h	h	h			h	h	h		h			h	h
	155													h		h					h		h	h		
	139	h	h		h	h		h	h	h	h	h			h	h	h	h		h	h	h	h	h	h	h

## ANEXO 1 – Continuação...

Primers		Mae T6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
P01	178									h							h		h							h
	168	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
P03	175				h											h					h	h				
	160		h	h			h		h	h		h					h	h		h				h		h
	152	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
P06	194				h											h					h	h	h			
	185	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	X	X		h	h	X		h	h	X	h	h	h	h
	175																									X
P09	225					h										h				h				h		
	210	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
P15	155	h					h		h		h		h	h	h			h	h		h	h	h	h		h
	145																									
	138	h	h	h	h	h	h	h	h	h		h			h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	
P18	160	h	h	h			h	h	h		h	h	h	h	h		h	h	h	h				h		h
	155	h	h	h	h	h	h	h	h	h		h	h	h	h					h	h	X		h	h	h
	139				h	h					h	h				h	h	h	h		h		h			

## ANEXO 2 – Formato da matriz com os resultados para o programa MLTR (RITLAND, 2010).

6, 1, 0	MT3, 3, 1, 1, 1, 2, 1, 2, 1, 2, 1, 1, 1, 3	MT5, 5, 1, 1, 2, 2, 1, 2, 1, 2, 1, 3, 1, 3
P01 P03 P06 P09 P15 P18	MT3, 3, 1, 1, 1, 2, 1, 2, 1, 2, 1, 1, 1, 3	MT5, 5, 1, 1, 1, 2, 2, 3, 1, 2, 0, 0, 3, 3
MT1!, 1, 1, 2, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT3, 3, 1, 1, 2, 2, 1, 2, 1, 2, 1, 3, 1, 1	MT5, 5, 1, 1, 2, 3, 2, 3, 1, 2, 0, 0, 1, 3
MT1, 1, 1, 2, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT3, 3, 1, 1, 0, 0, 1, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT5, 5, 1, 1, 1, 2, 2, 3, 1, 2, 1, 1, 1, 3
MT1, 1, 2, 2, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 1	MT3, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 2, 1, 2, 1, 3, 1, 3	MT5, 5, 1, 1, 1, 1, 3, 3, 1, 2, 1, 1, 1, 3
MT1, 1, 1, 1, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 1	MT3, 3, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 2, 1, 1, 1, 1	MT5, 5, 1, 1, 1, 3, 2, 3, 1, 2, 1, 3, 1, 3
MT1, 1, 1, 2, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 1	MT3, 3, 1, 1, 1, 2, 1, 1, 1, 2, 1, 1, 1, 3	MT5, 5, 1, 1, 1, 2, 2, 3, 1, 2, 1, 3, 1, 3
MT1, 1, 1, 2, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 1	MT3, 3, 1, 1, 1, 2, 2, 0, 0, 1, 1, 1, 1	MT5, 5, 1, 1, 1, 2, 3, 3, 1, 1, 1, 1, 3, 3
MT1, 1, 1, 2, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT3, 3, 1, 1, 1, 2, 2, 3, 2, 2, 1, 1, 1, 1	MT5, 5, 1, 1, 1, 2, 2, 3, 1, 2, 0, 0, 2, 3
MT1, 1, 2, 2, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 1	MT3, 3, 1, 1, 1, 1, 2, 2, 1, 2, 1, 1, 1, 1	MT5, 5, 1, 1, 2, 3, 3, 3, 2, 2, 1, 3, 1, 3
MT1, 1, 2, 2, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 3, 3	MT3, 3, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 1, 2, 1, 3, 1, 3	MT5, 5, 1, 1, 1, 2, 2, 3, 1, 2, 1, 1, 1, 2
MT1, 1, 2, 2, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT3, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 2, 1, 1, 1, 1	MT5, 5, 1, 2, 1, 1, 2, 2, 1, 2, 1, 1, 1, 1
MT1, 1, 1, 1, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT3, 3, 1, 1, 2, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 1	MT5, 5, 1, 1, 1, 2, 2, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 3
MT1, 1, 1, 1, 1, 1, 2, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT3, 3, 1, 1, 1, 2, 1, 2, 1, 2, 1, 1, 1, 3	MT5, 5, 1, 1, 1, 1, 3, 3, 1, 2, 1, 3, 3, 3
MT1, 1, 1, 1, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT3, 3, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT5, 5, 1, 2, 1, 1, 2, 2, 1, 2, 1, 3, 1, 3
MT1, 1, 1, 1, 1, 1, 2, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 1	MT3, 3, 1, 1, 0, 0, 1, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 1	MT5, 5, 1, 1, 1, 1, 3, 3, 2, 2, 1, 3, 1, 2
MT1, 1, 1, 2, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 1	MT3, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 2, 1, 2, 1, 1, 1, 1	MT5, 5, 1, 1, 1, 2, 2, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 3
MT1, 1, 2, 2, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 1	MT3, 3, 1, 1, 0, 0, 2, 2, 1, 2, 1, 3, 1, 3	MT5, 5, 1, 1, 1, 1, 3, 3, 1, 1, 0, 0, 1, 2
MT1, 1, 1, 1, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT3, 3, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT5, 5, 1, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 2, 1, 3, 1, 2
MT1, 1, 1, 2, 1, 1, 2, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT3, 3, 1, 1, 1, 2, 1, 2, 1, 2, 1, 1, 1, 3	MT5, 5, 1, 1, 2, 2, 2, 3, 1, 2, 0, 0, 1, 3
MT1, 1, 2, 2, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT3, 3, 1, 1, 1, 2, 2, 0, 0, 1, 1, 1, 1	MT5, 5, 1, 1, 1, 1, 2, 3, 1, 2, 1, 3, 1, 3
MT1, 1, 1, 2, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT3, 3, 1, 1, 1, 3, 1, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT6!, 6, 1, 1, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 3, 2, 3
MT1, 1, 1, 1, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT3, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 2, 1, 1, 1, 1	MT6, 6, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 2, 3
MT1, 1, 1, 2, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 3, 1, 3	MT3, 3, 1, 2, 2, 2, 1, 1, 0, 0, 1, 1, 1, 1	MT6, 6, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 2, 3
MT1, 1, 1, 1, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 1	MT4!, 4, 1, 1, 1, 2, 2, 3, 1, 1, 1, 3, 1, 3	MT6, 6, 1, 1, 1, 3, 2, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 2
MT1, 1, 1, 1, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT4, 4, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 1, 1, 3, 3, 1, 1	MT6, 6, 1, 1, 1, 1, 2, 2, 1, 2, 1, 1, 1, 2
MT1, 1, 1, 1, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT4, 4, 1, 2, 1, 2, 2, 2, 1, 2, 1, 3, 1, 3	MT6, 6, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 3, 2, 3
MT2!, 2, 1, 1, 1, 3, 3, 3, 1, 1, 1, 3, 1, 3	MT4, 4, 1, 1, 2, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 3, 1, 3	MT6, 6, 1, 1, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 2, 3
MT2, 2, 1, 1, 3, 3, 3, 3, 1, 1, 3, 3, 1, 1	MT4, 4, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT6, 6, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 3, 2, 3
MT2, 2, 1, 1, 1, 1, 3, 3, 1, 1, 3, 3, 1, 3	MT4, 4, 1, 1, 2, 2, 3, 3, 1, 1, 1, 3, 1, 2	MT6, 6, 1, 2, 1, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 2
MT2, 2, 1, 1, 1, 3, 3, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT4, 4, 1, 1, 1, 1, 2, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT6, 6, 1, 1, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 3, 3, 1, 3
MT2, 2, 1, 1, 2, 3, 3, 3, 1, 1, 1, 3, 1, 3	MT4, 4, 1, 1, 1, 1, 2, 3, 1, 1, 1, 3, 1, 3	MT6, 6, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 2, 3
MT2, 2, 1, 1, 3, 3, 3, 3, 1, 1, 1, 3, 1, 3	MT4, 4, 1, 1, 2, 2, 2, 3, 1, 1, 1, 3, 1, 3	MT6, 6, 1, 1, 1, 1, 0, 0, 1, 1, 3, 3, 2, 3
MT2, 2, 1, 1, 1, 1, 3, 3, 1, 1, 1, 3, 1, 3	MT4, 4, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT6, 6, 1, 1, 1, 1, 0, 0, 1, 1, 3, 3, 2, 3
MT2, 2, 1, 1, 2, 3, 3, 3, 1, 1, 1, 2, 1, 1	MT4, 4, 1, 2, 1, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 3, 1, 3	MT6, 6, 1, 1, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 3, 2, 3
MT2, 2, 1, 1, 3, 3, 3, 3, 1, 1, 1, 3, 1, 3	MT4, 4, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 3, 1, 3	MT6, 6, 1, 1, 1, 3, 2, 3, 1, 2, 1, 1, 1, 2
MT2, 2, 1, 1, 1, 3, 3, 3, 1, 1, 1, 3, 1, 3	MT4, 4, 1, 1, 1, 3, 2, 2, 1, 1, 3, 3, 1, 1	MT6, 6, 1, 2, 1, 2, 0, 0, 1, 1, 1, 1, 1, 3
MT2, 2, 1, 1, 1, 3, 3, 3, 1, 1, 1, 3, 3, 3	MT4, 4, 1, 1, 2, 2, 2, 3, 1, 2, 1, 1, 1, 3	MT6, 6, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 3, 1, 3
MT2, 2, 1, 1, 1, 1, 3, 3, 1, 1, 1, 3, 1, 1	MT4, 4, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 3, 1, 3	MT6, 6, 1, 2, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 3, 1, 3
MT2, 2, 1, 1, 3, 3, 3, 3, 1, 1, 3, 3, 1, 3	MT4, 4, 1, 1, 1, 2, 3, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 1	MT6, 6, 1, 1, 1, 2, 0, 0, 1, 2, 3, 3, 2, 3
MT2, 2, 1, 1, 3, 3, 3, 3, 1, 1, 3, 3, 1, 3	MT4, 4, 1, 1, 1, 2, 3, 2, 2, 1, 1, 1, 3, 1, 3	MT6, 6, 1, 1, 1, 3, 2, 3, 1, 1, 1, 3, 1, 2
MT2, 2, 1, 1, 3, 3, 3, 3, 1, 1, 1, 3, 1, 3	MT4, 4, 1, 1, 1, 1, 2, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT6, 6, 1, 1, 1, 3, 2, 3, 1, 1, 1, 3, 0, 0
MT2, 2, 1, 1, 1, 1, 3, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 1	MT4, 4, 1, 1, 1, 1, 2, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT6, 6, 1, 1, 1, 1, 2, 3, 1, 1, 1, 3, 1, 2
MT2, 2, 1, 1, 0, 0, 3, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT4, 4, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 3, 1, 1	MT6, 6, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 1, 2, 1, 3, 2, 3
MT2, 2, 1, 1, 1, 1, 3, 3, 1, 1, 1, 3, 1, 1	MT4, 4, 1, 1, 1, 2, 3, 3, 1, 1, 1, 3, 1, 1	MT6, 6, 1, 1, 1, 1, 2, 2, 1, 1, 1, 1, 2, 2
MT2, 2, 1, 1, 0, 0, 3, 3, 1, 1, 1, 3, 1, 1	MT4, 4, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 1, 1, 1, 3, 1, 1	MT6, 6, 1, 2, 1, 2, 0, 0, 1, 1, 3, 3, 2, 3
MT2, 2, 1, 1, 1, 3, 3, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 3	MT4, 4, 1, 1, 2, 2, 2, 3, 1, 1, 3, 3, 1, 3	
MT2, 2, 1, 1, 3, 3, 3, 3, 1, 1, 1, 3, 1, 3	MT4, 4, 1, 1, 2, 2, 3, 3, 1, 2, 1, 3, 1, 3	
MT2, 2, 1, 1, 1, 3, 3, 3, 1, 2, 1, 3, 1, 3	MT5!, 5, 1, 1, 1, 2, 2, 3, 1, 2, 1, 1, 1, 3	
MT2, 2, 1, 1, 1, 3, 3, 3, 1, 1, 1, 3, 1, 3	MT5, 5, 1, 1, 2, 2, 2, 3, 1, 1, 1, 3, 1, 3	
MT2, 2, 1, 1, 1, 3, 3, 3, 1, 1, 1, 3, 1, 3	MT5, 5, 1, 1, 1, 2, 3, 3, 1, 2, 1, 1, 3, 3	
MT3!, 3, 1, 1, 1, 2, 1, 2, 1, 2, 1, 1, 1, 3	MT5, 5, 1, 1, 1, 2, 3, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 1	

