

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

SILMARA CHAVES DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA E MOLECULAR DA COLEÇÃO DE
GERMOPLASMA DE SISAL DA EMBRAPA ALGODÃO**

**CAMPINA GRANDE – PB
FEVEREIRO/2017**

SILMARA CHAVES DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA E MOLECULAR DA COLEÇÃO DE
GERMOPLASMA DE SISAL DA EMBRAPA ALGODÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias / Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Liziane Maria de Lima

Coorientador: Prof. Dr. José Jaime Vasconcelos Cavalcanti

CAMPINA GRANDE-PB

FEVEREIRO/2017

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

S729c Souza, Silmara Chaves de.
Caracterização morfoagronômica e molecular da coleção de germoplasma de sisal da Embrapa Algodão [manuscrito] / Silmara Chaves de Souza. - 2017.
53 p. : il. color.

Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2017.

"Orientação: Profa. Dra. Liziane Maria de Lima, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa".

"Co-Orientação: Prof. Dr. José Jaime Vasconcelos Cavalcanti".

1. Agave. 2. Divergência genética. 3. Marcador ISSR. 4. Germoplasma de sisal. I. Título.

21. ed. CDD 633.577

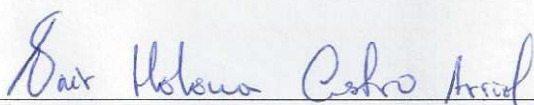
**CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA E MOLECULAR DA COLEÇÃO DE
GERMOPLASMA DE SISAL DA EMBRAPA ALGODÃO**

SILMARA CHAVES DE SOUZA

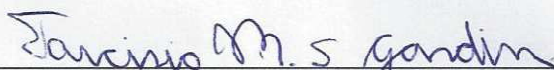
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias / Área de Concentração: Biotecnologia.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2017

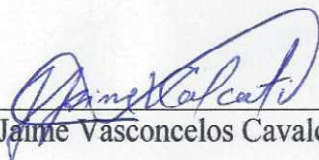
Banca Examinadora:



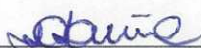
Prof.^a Dr.^a Nair Helena Castro Arriel (D. Sc., Agronomia) – Embrapa Algodão



Prof. Dr. Tarcísio Marcos de Souza Gondim (D. Sc., Agronomia) – Embrapa Algodão



Prof. Dr. José Jaime Vasconcelos Cavalcanti (D. Sc., Biologia Molecular) – Embrapa Algodão
Coorientador



Prof.^a Dr.^a Liziane Maria de Lima (D. Sc., Biologia Molecular) – Embrapa Algodão
Orientadora

À Deus que tem me abençoado e amparado em tantos momentos difíceis.

À minha mãe, Zoraide, e ao meu esposo Hugo por serem meus
maiores exemplos de luta, coragem e dedicação.

Ofereço!

In memoriam da minha filha, Luna.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, primeiramente, por nunca me deixar faltar a fé e me amparar em tantos momentos difíceis durante o andamento deste trabalho; obrigada Senhor por ter me concedido a vida e por fazer de mim um ser humano melhor a cada dia.

À minha mãe, Zoraide, por toda dedicação que teve em me proporcionar uma educação de valores inestimáveis; meu maior exemplo de luta, coragem e perseverança.

Agradeço ainda de modo especial ao meu esposo, Hugo Meira, pela alegria de dividir a vida com ele, por suportar a minha ausência em tantas ocasiões durante todo o curso e me ajudar de todas as maneiras possíveis para a realização desse sonho.

À minha orientadora Dr^a. Liziane Maria de Lima, por ter acreditado no meu potencial e feito de tudo para que eu tivesse êxito no desenvolvimento deste trabalho, por ser um exemplo de profissional a ser seguido; pela pessoa íntegra e de uma ética incomparável; obrigada pelos ensinamentos, conselhos, paciência e, sobretudo pela amizade.

Ao meu coorientador Dr. José Jaime Vasconcelos Cavalcanti por todas as vezes que precisei de sua ajuda, sempre esteve disposto a me ensinar e encontrar soluções para os problemas que surgiram durante esses dois anos de curso, pelo exemplo de profissional a ser seguido; muito obrigada por tudo.

À Dr^a. Roseane Cavalcanti dos Santos por estar sempre disposta a me ajudar quando precisei e pelo referencial de profissional que é.

Ao Prof. Dr. Diogo Neder pela orientação no estágio de docência e por ser paciente em me ensinar a prática do dia-a-dia do professor universitário.

Ao amigo Jean Pierre, pelo companheirismo e paciência em transferir seu conhecimento na área e por auxiliar na interpretação dos meus resultados.

À amiga Carliane Rebeca, pelas palavras de apoio, pelo companheirismo e ensinamentos durante a execução da pesquisa, pelos momentos vividos e amizade que fica.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão, Vandrê Guevara, Taíza Soares, Fátima Caetano, Marília Duarte, Socorro Lacerda, Wellison Dutra e Claudiene Rafalski, pelas trocas de experiências, ensinamentos e momentos de descontração.

Aos técnicos: Fábria Suely, Terezinha Duarte, Adelardo Lira, Gilvan Lima e Karina Araújo pela disponibilidade na execução deste trabalho.

À Isaias Alves, pessoa de uma alegria incomparável, sempre disposto a me ajudar durante a coleta dos dados, cuidadoso com o experimento, me ensinou muito sobre a cultura do sisal; muito obrigada meu amigo.

Ao Sr. Luriorlando da sede da Embrapa em Monteiro-PB, pela receptividade e atenção sempre que precisei.

Aos amigos da turma 2015.1 do Mestrado em Ciências Agrárias da UEPB, pela convivência no decorrer do curso e pelas novas amizades firmadas.

As amigas Nadja Glaucia e Vanessa Guedes, pelos momentos compartilhados, alguns de tristeza, porém muitos de alegria, pois é assim que a vida acontece. Quero tê-las para sempre no meu círculo de amizades.

À Embrapa Algodão, pela infraestrutura concedida; a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos; ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias (PPGCA) da UEPB pelo apoio durante todo o curso.

A todos os professores do PPGCA, muito obrigada por todos os ensinamentos e por não desistirem da educação nesse país.

A todos àqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

SOUZA, Silmara Chaves de. Universidade Estadual da Paraíba/ Embrapa Algodão. Fevereiro de 2017. **Caracterização morfoagronômica e molecular da coleção de germoplasma de sisal da Embrapa Algodão**. Orientadora: Liziane Maria de Lima; Coorientador: José Jaime Vasconcelos Cavalcanti.

O conhecimento da diversidade genética disponível na coleção de germoplasma de sisal é fundamental para os programas de melhoramento, para tanto é imprescindível se obter o máximo de informações quanto às características relacionadas à espécie. Dados morfoagronômicos e moleculares quando analisados principalmente em conjunto são determinantes para estudos de divergência genética entre acessos. Objetivou-se, com este trabalho, avaliar a divergência genética presente nos acessos de *Agave* da Coleção Ativa de Germoplasma da Embrapa Algodão por meio de dados morfoagronômicos e moleculares. Trinta e sete acessos de *Agave* são mantidos no campo experimental em Monteiro-PB e foram avaliadas quanto as seguintes características: número de folhas (NFO), altura da planta (ALT), comprimento de folha (CFO), peso da folha (PFO), peso da mucilagem fresca (PMF), peso da mucilagem seca (PMS), peso da fibra fresca (PFIF), peso da fibra seca (PFIS), comprimento da fibra (CFI), presença de espinhos nas bordas (PEB), perfilhamento (PF) e resistência ao dobramento (RD). Dez oligonucleotídeos ISSR (Inter Sample Sequence Repeat) foram utilizados para as análises moleculares. Os dados foram interpretados como qualiquantitativos para os caracteres morfoagronômicos e qualitativos binários para os marcadores moleculares. Os dados agronômicos foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias foi feita pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As medidas de dissimilaridade foram obtidas por meio da distância de Gower para os dados morfoagronômicos e pelo coeficiente de Jaccard para os dados moleculares. Foi feita a soma das matrizes de dissimilaridade dos dados morfoagronômicos e moleculares; e o agrupamento foi feito pelo método hierárquico UPGMA e de otimização de Tocher. As características agronômicas apresentaram elevada variabilidade genética entre os acessos de sisal. Os acessos IAC foram os que apresentaram menor distância entre si, indicando possível base genética estreita e alto grau de parentesco. Os Híbridos Quênia e RN como os acessos mais similares e o acesso Tatuí 2 o mais divergente, sendo indicados para possíveis cruzamentos. Os resultados obtidos neste estudo darão suporte ao programa de melhoramento da cultura, podendo possibilitar o aparecimento de materiais superiores.

Palavras-chave: *Agave*, divergência genética, marcador ISSR.

ABSTRACT

Knowledge of the genetic diversity available in the sisal germplasm collection is essential for breeding programs, so it is imperative to obtain as much information as the characteristics related to the species. Morphoagronomic and molecular data when analyzed mainly together are determinants for studies of genetic divergence between accessions. The objective of this study was to evaluate the genetic divergence present in the Agave accessions of the Embrapa Cotton Germplasm Active Collection by means of morphoagronomic and molecular data. Thirty-seven Agave accessions were kept in the experimental field in Monteiro-PB and the following characteristics were evaluated: leaf number (NFO), plant height (ALT), leaf length (CFO), leaf weight, Dry weight (PFIF), dry fiber weight (PFIS), fiber length (CFI), presence of border spikes (PEB), tillering (PF) and resistance to folding (DR). Ten ISSR (Inter Sample Sequence Repeat) oligonucleotides were used for molecular analyzes. The data were interpreted as qualitative for the morphoagronomic and qualitative binary characters for the molecular markers. The agronomic data were submitted to analysis of variance and the means comparison was done by the Scott-Knott test at 5% probability. The dissimilarity measurements were obtained by Gower distance for the morphoagronomic data and by the Jaccard coefficient for the molecular data. The sum of the matrices of dissimilarity of the morphoagronomic and molecular data was made; and the grouping was done by the hierarchical UPGMA method and Tocher optimization. The agronomic characteristics presented high genetic variability among the sisal accessions. IAC accesses were the ones that presented the least distance between them, indicating a possible narrow genetic base and high degree of kinship. Hybrids Kenya and RN as the most similar accesses and the access Tatuí 2 the most divergent, being indicated for possible crossings. The results obtained in this study will support the crop improvement program, which may allow the appearance of superior materials.

Keywords: *Agave*, genetic divergence, ISSR marker.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Relação dos acessos de sisal para as avaliações morfoagronômicas e moleculares.....	26
Tabela 2.	Dados da precipitação anual no Município de Monteiro/PB nos anos de 2015 e 2016.....	27
Tabela 3.	Escala de notas atribuídas aos caracteres qualitativos para trinta e sete acessos da Coleção Ativa de Germoplasma de sisal em Monteiro-PB, 2016.....	28
Tabela 4.	Classificação das fibras de sisal quanto às classes e comprimento, de acordo com o decreto nº 31.329 de 22 de agosto de 1952.....	28
Tabela 5.	Sequência dos oligonucleotídeos ISSR desenvolvidos pelo laboratório de Biotecnologia da Universidade da Columbia Britânica (UBC).....	30
Tabela 6.	Resumo da análise de variância e parâmetros genéticos e ambientais obtidos para nove caracteres agronômicos avaliados em 37 acessos de sisal da coleção Ativa de Germoplasma em Monteiro-PB, 2016.....	36
Tabela 7.	Comparação de médias para as características agronômicas número de folhas (NFO); altura da planta (ALT); comprimento de folha (CFO); massa da folha (MFO); massa da mucilagem fresca (MMF); massa da mucilagem seca (MMS); massa da fibra fresca (MFIF); massa da fibra seca (MFIS) e comprimento de fibra (CFI) de 37 acessos coleção Ativa de Germoplasma de sisal em Monteiro-PB, 2016.....	37
Tabela 8.	Bandas geradas e polimórficas dos oligonucleotídeos utilizados na caracterização dos acessos de sisal.....	38
Tabela 9.	Agrupamento dos acessos de sisal pelo método de otimização de Tocher, a partir dos dados morfoagronômicos e moleculares.....	40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A – Planta adulta de sisal, B – Perfilhos oriundos da planta mãe, C – Escapo floral, D – Panícula com flores em cachos, E – Bulbilho, F – Cápsula madura e sementes redondo-triangulares. Fonte: Silmara Chaves de Souza..... 17
- Figura 2.** Produção mundial de sisal (Fibra e manufaturados). Fonte: CONAB, (2013)..... 18
- Figura 3.** Produtos obtidos da fibra de sisal: A – Fios *Gold*, *Green* e *Untreated*; B – Cordas do tipo calibrada e barbante; C – Papel do tipo *Kraft*; D – Biomanta; E – Artesanato (cesto). Fontes: <http://www.cwestern.com>; <http://www.casadascordas.com.br/>; <http://www.sisall.com.br/>; <http://www.plotag.com.br/papeis-kraft>; <https://www.elo7.com.br>..... 20
- Figura 4.** Padrão de bandas obtidas pelo oligonucleotídeo UBC 812 para os 37 acessos de sisal (Tabela 1). M – Marcador 100 e 50 pb (*Ludwig Biotec*)..... 39
- Figura 5.** Dendograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA..... 42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. Geral	13
2.2. Específicos	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1. Origem e histórico do sisal	14
3.2. Classificação botânica	15
3.3. Morfologia	15
3.4. Importância socioeconômica do sisal	16
3.5. Aplicações do sisal	18
3.6. Fontes de Germoplasma	20
3.7. Descritores Morfoagronômicos	21
3.8. Marcadores Moleculares	21
3.9. Determinação da diversidade genética	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Recursos genéticos e condução do experimento	25
4.2. Caracterização morfoagronômica	26
4.3. Extração de DNA genômico	27
4.4. PCR-ISSR (Inter Sample sequence repeat)	28
4.5. Análise estatística	30
4.6. Análise conjunta dos dados	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

O sisal é uma planta que teve origem no continente Americano. Alguns estudiosos relatam que a sua utilização é datada de muito antes do descobrimento das Américas por Cristovão Colombo. No Brasil as primeiras plantações de sisal datam do início do século XX com plantios na Bahia (SOUSA, 2004).

O México é considerado o centro de origem do gênero *Agave*, especialmente as zonas áridas e semiáridas do país, porém, Estados Unidos, América Central e América do Sul também possuem espécies distribuídas. De todas as espécies de *Agave*, cerca de 75% são encontradas no México, destas, 55% são encontradas exclusivamente neste país (GRANICH et al., 2005).

É uma cultura que apresenta grande importância em regiões semiáridas, tendo em vista a possibilidade do aproveitamento de todas as partes da planta. As fibras de sisal são totalmente aproveitadas nas indústrias de artesanato e cordoalha e na construção civil, são incorporadas a argamassa; já a indústria automobilística a utiliza na fabricação de painéis e bancos, substituindo plástico e fibra de vidro. A mucilagem também é aproveitada na alimentação animal, durante o período de seca prolongada ou de escassez de pasto em regiões que sofrem com grandes períodos de seca e o pó que sai do processo de batimento das fibras pode ser utilizado como adubo orgânico (SILVA e BELTRÃO, 1999).

Do ponto de vista econômico e social no Brasil, o cultivo do sisal, incluindo as etapas de beneficiamento, gera emprego e renda em regiões com baixos índices de desenvolvimento humano, tanto na agricultura familiar quanto nas cidades, sendo em muitos casos, o único meio de sobrevivência de muitas famílias. A cultura ajuda ainda a fixar o homem no campo, mantendo suas origens (SUINAGA et al., 2006; GARCÍA-HERRERA et al., 2010).

Sabendo-se da importância do sisal para o Brasil e principalmente para a região Nordeste, a Embrapa Algodão criou, em 1996, a Coleção Ativa de Germoplasma de sisal, que consiste na conservação de acessos para fins de estudos de divergência genética e utilização no programa de melhoramento genético da cultura.

Ressalta-se que esses estudos são de extrema importância, principalmente por fornecerem parâmetros para a identificação de genitores que possibilitam o aparecimento de materiais superiores quando cruzados, além de facilitarem o conhecimento da base genética da população (FERRÃO et al., 2002).

Em coleções de germoplasma, estudos de divergência genética podem ser executados por várias técnicas, como: a caracterização morfoagronômica que seleciona descritores que melhor representam cada acesso, esses descritores podem ser de natureza quantitativa e, ou qualitativa (ENGELS, 1993); a caracterização molecular, utilizada para complementar dados fenotípicos com a utilização de marcadores moleculares. Com as informações obtidas é possível que pesquisadores, principalmente melhoristas, constituam ferramentas importantes para seus estudos.

Vários tipos de marcadores moleculares estão disponíveis para a caracterização da diversidade genética em plantas, porém, os que usam a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) apresentam maiores vantagens por permitir a análise de polimorfismo em vários genótipos sem a influência do ambiente (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Para a caracterização molecular da diversidade em coleções de germoplasmas, os marcadores ISSR (Inter Sample Sequence Repeat) é um dos mais recomendados, principalmente por serem úteis nas análises de espécies relacionadas evolutivamente, com resultados confiáveis, por apresentar grande dispersão no genoma, grandes números de locos polimórficos em quantidades suficientes, além da rapidez em seus resultados e baixo custo em comparação a outros marcadores (RODRIGUES, 2010).

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho identificar a divergência genética entre acessos de sisal conservados na Coleção Ativa de Germoplasma da Embrapa Algodão, por meio da caracterização morfoagronômica e molecular, a fim de caracterizar e detectar os genótipos mais promissores para subsidiar o programa de melhoramento da cultura.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Determinar a diversidade genética disponível na Coleção Ativa de Germoplasma de sisal da Embrapa Algodão.

2.2. Específicos

- Caracterizar morfoagronomicamente e por meio de marcadores moleculares ISSR, trinta e sete acessos de sisal;
- Avaliar as características morfoagronômicas por meio de caracteres quantitativos e qualitativos;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Origem e histórico do sisal

Originário da península de Yucatã no México, o sisal recebeu esse nome devido à existência de uma erva nativa conhecida como zizal-xiu (MARTIN et al., 2009). Era uma planta bastante utilizada também pelos nativos na preparação de uma bebida fermentada chamada pulque, oriunda do suco da folha. Trazida para o Brasil por volta de 1903 pelo engenheiro agrônomo Horácio Hurlia Júnior, o sisal (*Agave sisalana*) adaptou-se bem ao clima do nordeste brasileiro com os primeiros bulbilhos introduzidos na Bahia (ALVES, 2005).

Na Paraíba, as primeiras mudas foram introduzidas em 1911, trazidas da Bahia. Porém, as primeiras plantações com fins comerciais começaram a aparecer na Paraíba entre os anos de 1930 e 1938 e em 1939 na Bahia, onde a cultura foi identificada como potencialmente produtiva. Iniciando-se assim o plantio, em campos experimentais, estimulado pela demanda da fibra na segunda guerra mundial. Passada a guerra, devido ao aumento da demanda, aliado as condições ambientais, o sisal consolidou-se na Paraíba. Nesse período, o Estado tornou-se o maior produtor da fibra, colaborando para que o Brasil se tornasse um dos maiores exportadores de sisal do mundo (SUINAGA et al., 2006). Atualmente, os estados brasileiros que mais produzem a fibra são: Bahia (96,4%), seguidos da Paraíba (3,4%), Ceará (0,6%) e Rio Grande do Norte (0,1%) (IBGE, 2015).

As regiões de clima mais quente tendem a favorecer o desenvolvimento da planta de sisal, porém, a espécie também pode ser cultivada em regiões tropicais e subtropicais (SILVA et al., 2011). No semiárido do Nordeste brasileiro, o sisal apresenta uma boa adaptação, por se tratar de uma planta semixerófila a qual possui resistência à secas prolongadas e altas temperaturas. Esta adaptabilidade se deu, sobretudo, devido às condições climáticas da região, com temperaturas médias que variam entre 28°C e 30°C (ABREU, 2010).

Dessa forma, pode-se afirmar que o cultivo do sisal nas regiões semiáridas, além da importância histórica, destaca-se também na geração de empregos em localidades onde não há outras fontes de renda que ofereçam resultados econômicos satisfatórios para a população (SANTOS, 2006).

3.2. Classificação botânica

O sisal é uma planta monocotiledônea, série Lilioflorea, pertencente à família Agavaceae. Suas folhas produzem a principal fibra dura existente entre as plantas, utilizada em larga escala pelas indústrias de diversos segmentos; a família Agavaceae compreende cerca de 25 gêneros e 637 espécies, sendo que as mais utilizadas, principalmente pela qualidade de suas fibras, são: *A. Sisalana* e *A. foudcloydes* (MEDINA, 1959; JUDD et al., 2007).

3.3. Morfologia

A folha do sisal possui forma lanceolada linear, ligadas diretamente ao caule, de coloração verde-escuro, quase plana, rígida e lisa, podendo chegar a medir dois metros (Figura 1A); porém, normalmente mede de 90 a 120 cm. Geralmente, a maioria das espécies não possuem espinhos nas bordas, mas possuem um acúleo de 20 a 25 mm de comprimento de formato cônico na extremidade da folha (MEDINA, 1959).

É uma planta com sistema radicular fibroso em forma de tufo, de caule curto (acaulescente). Possui dois tipos de raízes, as transportadoras que são responsáveis por fixar a planta no solo e suportar o peso das folhas, sendo, portanto, raízes mais profundas, e as alimentadoras, responsáveis por absorver os nutrientes do solo por meio dos pêlos radiculares, são mais superficiais, pois as camadas mais próximas da superfície do solo são mais ricas em nutrientes (SILVA et al., 2008).

Possui escapo floral (Figura 1C) com aproximadamente 8 metros de comprimento e cerca de 15 cm de diâmetro que surge quando a planta emite a inflorescência, ou seja, quando as folhas centrais de juntam ao redor do ponto apical. No escapo existem cerca de 40 flores monocárpicas e hermafroditas distribuídas em cachos que deixam o escapo com a aparência de uma pirâmide (Figura 1D) (MEDINA, 1959; SILVA et al., 2008).

A propagação do sisal é de forma assexuada, por intermédio de perfilhos ou bulbilhos (Figura 1B e 1E); todavia, podem se reproduzir de forma sexuada quando suas flores são polinizadas por morcegos e em menor escala por alguns insetos, como abelhas, mariposas e até mesmo aves. Os frutos e sementes capazes de germinar são obtidos das gemas inferiores do escapo floral; eles amadurecem cerca de seis meses após a flor ser polinizada. As sementes

são de cor preta e medem de seis a sete milímetros no seu maior comprimento (Figura 1F) (MENDONZA, 2007).

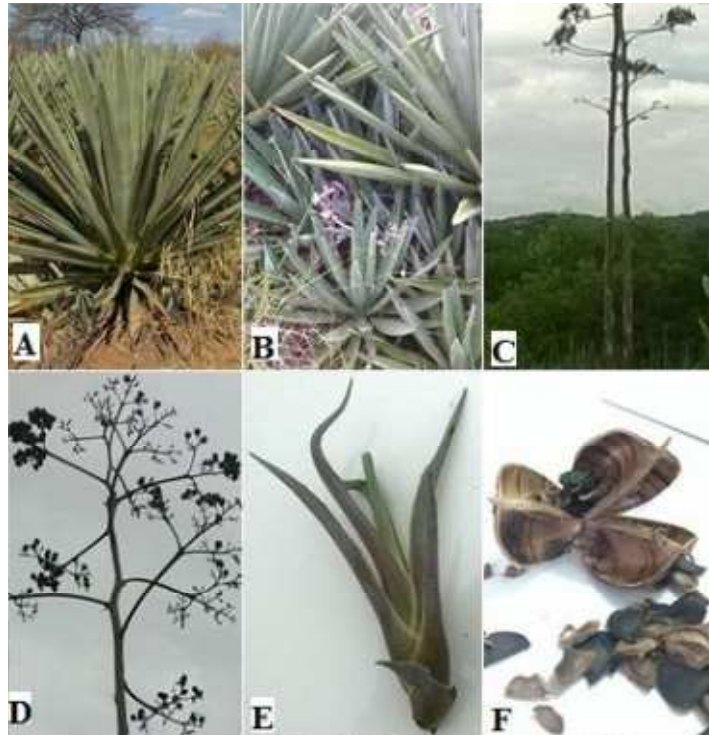


Figura 1: A – Planta adulta de sisal, B – Perfilhos oriundos da planta mãe, C – Escapo floral, D – Panícula com flores em cachos, E – Bulbilho, F – Cápsula madura e sementes redondo-triangulares. Monteiro – PB, (2016). Fonte: Silmara Chaves de Souza.

3.4. Importância socioeconômica do sisal

O sisal é, atualmente, um produto agroindustrial de grande importância econômica e social existente no semiárido brasileiro; explorado principalmente pelas famílias que sobrevivem da agricultura em uma região cujo maior Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDHM) é de 0,678 (ATLAS BRASIL, 2013).

É a principal cultura geradora de emprego e renda no alto sertão da Bahia, estado que ocupa o topo da produção brasileira da matéria prima. Apesar de o sisal ser o principal produto agroindustrial do semiárido brasileiro, atualmente sua exploração vem sendo assolada por uma seca histórica, porém, devido a sua forte adaptação a climas áridos, vem conseguindo manter os produtores no campo. Essa forte adaptação da cultura ao nordeste faz o Brasil manter-se como o maior produtor (48,8%) e exportador (80%) de sisal do mundo; outros

principais países produtores são a Tanzânia, China, Quênia, Madagascar, México e Haiti (Figura 2) (CONAB, 2013).

Atualmente tem-se observado uma queda na produção da fibra e manufaturados de sisal no Brasil, em 2014 a produção foi de 95,4 mil toneladas, em 2015 foi de 91,1 mil toneladas, bem diferente de 2016 com uma queda histórica de 12,18% em relação ao ano anterior, produzindo-se apenas 80 mil toneladas. Esse valor é bem próximo aos produzidos nos anos de 2012 e 2013, onde muito se falou na sucumbência da cadeia produtiva de sisal pelo lado da oferta. Apesar da evidente baixa na produção, sabe-se que o sisal possui uma grande importância econômica para as regiões produtoras e que o mercado externo, principalmente, exige uma grande demanda pela fibra e por produtos diversos, o que gera renda tanto para os produtores no campo quanto para as indústrias de beneficiamento (CONAB, 2016).

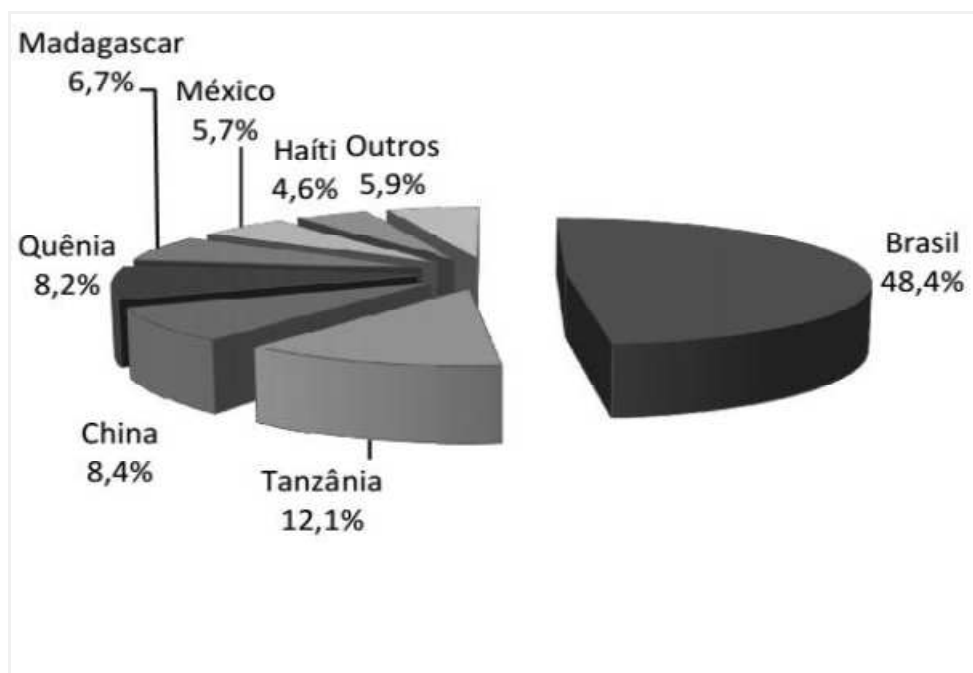


Figura 2. Produção mundial de sisal (Fibra e manufaturados). Fonte: CONAB, (2013).

Nos últimos anos vem crescendo no mundo o interesse pelo desenvolvimento de tecnologias ecológicas que promovam menos impacto ao ambiente. Produtos sintéticos, como os plásticos, detêm a maior atenção por parte dos órgãos de defesa do meio ambiente, por causarem toxidez durante a sua produção e necessitarem de muito tempo para degradação, gerando, dessa forma, grandes quantidades de lixo na natureza.

Buscando resolver essa problemática, diversos setores da sociedade vêm tentando trabalhar para garantir a preservação do meio ambiente. No Brasil existe a Lei 6.938 de 31 de agosto de 1981 que atribui aos estados e municípios o poder de estabelecer limites e padrões para a instalação e licenciamento das indústrias, exigindo o estudo de impacto ambiental (BRASIL, 2008).

Observado essa necessidade, as empresas voltadas para o ramo vêm trabalhando no desenvolvimento de tecnologias alternativas que ofereçam produtos com resultados satisfatórios e que ao serem descartados após sua vida útil, não causem danos ao meio ambiente. A fibra de sisal vem ganhando espaço nessas discussões por ser uma alternativa ecológica para as indústrias automobilísticas e de construção civil, com enorme potencial na substituição de plásticos e fibra de vidro, por exemplo.

3.5. Aplicações do sisal

Historicamente a principal aplicação do sisal tem sido na produção de cordoalha, ou seja, todos os produtos de sisal como fios, barbantes, cordéis, todos os tipos de cordas que são usadas na agricultura, pecuária, indústria e comércio; porém, sabe-se que 2/3 da fibra de sisal são destinadas a fabricação de *baler twine*, um tipo de barbante produzido com fios oleados, exclusivamente para o mercado externo, fabricado nas cores laranja, verde e natural e identificados como *Gold*, *Green* e *Untreated*, respectivamente (Figura 3A). Os estoques fora do padrão são comercializados no mercado nacional para pequenos agricultores e usados nos serviços de amarração em geral (SILVA e BELTRÃO, 1999).

Existem, porém, outros produtos provenientes da fibra do sisal que devemos destacar, os quais apresentam importante papel na diversidade de aplicações que a cultura possui, como o barbante singelo, conhecido como fio comercial ou não oleado, difere do *baler twine* por ser mais fino e pela emulsão em que é inserido; os cordéis, que nada mais são do que uma pequena quantidade de fios (dois a três) não oleados e retorcidos; as cordas que são fabricadas tanto com fios oleados ou secos variam em diâmetro (5 a 40 mm) conforme o destino final (SILVA e BELTRÃO, 1999; SILVA, 2010; ALVARENGA, 2012).

A corda calibrada (Figura 3B) é outro tipo de corda que recebe um melhor acabamento para perder os “pêlos” (partes de fibra que se soltam ao longo da corda), para isso elas passam por máquinas “barbeadeiras” as quais possuem lâminas que deixam os fios mais regulares; esse tipo de corda é utilizado no centro de cabos de aço, em elevadores, por exemplo, aprimorando sua função (SILVA e BELTRÃO, 1999).

Além de todos os produtos do setor de cordoalha, podemos citar a fabricação de papel do tipo Kraft (Figura 3C) a partir da “bucha” de sisal, que são os fios que se soltam no processo de desfibramento que podem gerar esse papel de grande resistência (Figura 3B). No campo da construção civil as buchas também são utilizadas na composição de massas para forros de gesso, polimento de revestimento cerâmico; e pode ser ainda incorporada na construção de casas residenciais para obter-se uma maior resistência aos compósitos e ainda pode ser usado na fabricação de estofados e painéis de carros (SILVA, 2010). O sisal tem sido utilizado também na fabricação de artesanatos em geral como bolsas, cadeiras de balanço, objetos de decoração, cestos (Figura 3E), entre outros (SANTOS et al., 2007).



Figura 3: Produtos obtidos da fibra de sisal: A – Fios *Gold*, *Green* e *Untreated*; B – Cordas do tipo calibrada e barbante; C – Papel do tipo *Kraft*; D – Biomanta; E – Artesanato (cesto).

Fontes: <http://www.cwestern.com/>; <http://www.casascordas.com.br/>;
<http://www.sisall.com.br/>; <http://www.plotag.com.br/papeis-kraft>; <https://www.elo7.com.br>.

Outro destaque para o uso do sisal é na indústria química e de fármacos; recentemente, Lima et al. (2013) avaliaram a produção de celulose bacteriana através de fermentação submersa estática utilizando o líquido do sisal como meio de cultivo alternativo obtendo excelentes resultados. Alguns tipos de biomantas (Figura 3D) também são produzidas a partir da fibra de sisal e são largamente utilizadas na cobertura de encostas evitando a erosão dessas áreas.

Alguns outros produtos oriundos dessa planta são a tequila, produzida a partir de *Agave tequilana* ou *Agave azul*, uma espécie de planta do gênero *Agave*, como é comumente

conhecido no México (APAEB, 2013), remédios, biofertilizantes, bioinseticidas, adubo orgânico e ração animal.

Apesar de toda importância que o sisal tem para Brasil e para vários países, a quantificação e a exploração da variabilidade dessa espécie ainda são insuficientes, necessitando-se, portanto, de maiores estudos que promovam o desenvolvimento e o melhoramento da espécie, e em consequência a exploração mais eficiente da cultura, incentivando o aumento da demanda comercial e a retomada da produção em regiões que no passado já foram conhecidas como grandes produtoras.

3.6. Fontes de Germoplasma

Devido às alterações ambientais, tem-se falado muito na conservação da biodiversidade para evitar perdas de espécies. Para isso, foram criadas unidades conservadoras de material genético, denominadas coleções de germoplasma, que tem por finalidade a coleta, preservação, caracterização, avaliação e intercâmbio de acessos. Essas coleções podem ser ativas, com plantas mantidas em suas condições naturais, e coleções de base, que conservam parte da planta, como sementes, em câmaras frias (WOEHL, 2011).

Na condução de um programa de melhoramento genético é necessário que haja à disposição do melhorista uma coleção de germoplasma com acessos que apresentem a maior variabilidade genética possível, proporcionando uma maior assertividade em termos de complementaridade. A coleção deve ser caracterizada para auxiliar na escolha dos acessos mais promissores que poderão compor as fases de pré-melhoramento ou hibridação, por exemplo (RAMOS et al., 2015).

Segundo Valois et al. (2001) existem diversos tipos de caracterização que podem ser feitas para ter um conhecimento mais detalhado dos acessos: morfoagronômica, bioquímica, citogenética ou molecular. A utilização de marcadores moleculares, associada a descritores morfológicos e agrônômicos tem sido muito útil no estudo de diversidade genética dessas coleções de germoplasma (DIAS et al., 1994).

3.7. Descritores Morfoagronômicos

A caracterização morfoagronômica é fundamental para a conservação de muitas espécies e para o melhoramento genético vegetal. Nas coleções de germoplasma, a caracterização morfoagronômica tem sido utilizada para se obter informações dos acessos, descrever características importantes e, conseqüentemente, contribuir com os programas de melhoramento genético por identificar indivíduos superiores e quantificar a diversidade disponível (ARAÚJO e NASS, 2001). Na maioria dos germoplasmas, é comum a caracterização com base em dados morfológicos e agronômicos simultaneamente, o que explica a fundição dos nomes.

Nos estudos morfoagronômicos são utilizados descritores que permitem conhecer as populações naturais e determinar o seu potencial de uso. Para que os genótipos sejam caracterizados corretamente, é necessária uma lista de descritores específica, que seja capaz de diferenciá-los. Diversos atributos podem ser utilizados para definir um material, todavia os caracteres mais úteis são aqueles que podem ser facilmente detectados e que possuem alta herdabilidade e valor agronômico, os quais permitam diferenciar um acesso do outro; como por exemplo: altura da planta, número de folhas, comprimento de fibras, massa fresca, entre outras características (SANTOS e BETTENCOURT, 2001).

3.8. Marcadores Moleculares

Os marcadores genéticos ou moleculares são algumas das ferramentas mais modernas utilizadas no conhecimento do grau de similaridade entre acessos e cultivares, quando analisados entre e dentro de populações naturais, na identificação de genes associados a estresses bióticos e abióticos, além de serem reconhecidamente úteis na avaliação e caracterização de germoplasmas (BERED et al., 1997).

Na caracterização molecular utilizam-se os marcadores moleculares, que segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), são todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene que se expressa ou de segmentos específicos de DNA. Esses marcadores podem gerar quantidades suficientes de informações que quando avaliadas junto às características fenotípicas proporcionam o agrupamento de genótipos e, conseqüentemente, o cruzamento mais eficiente (SPOONER et al., 2005). Os marcadores moleculares também possuem vantagens sobre os marcadores morfológicos, por permitirem informações puramente

genéticas e fornecerem, praticamente, um número ilimitado de polimorfismo distribuído aleatoriamente ao longo do genoma, permitindo a distinção entre acessos com morfologia similar de forma simples e a custos reduzidos (MOULIN et al., 2012).

Existem diversos tipos de marcadores capazes de diferenciar os acessos com grande exatidão e confiabilidade, como por exemplo: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) e *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR), os quais foram os marcadores mais utilizados entre os anos de 1980 e 1990, responsáveis pelo surgimento dos primeiros mapas genéticos de várias espécies cultivadas, de numerosos estudos de diversidade genética e da descoberta de genes. Já os microssatélites *Simple Sequence Repeats or microsatellite* (SSR) e os *Inter Sample Sequence Repeat* (ISSR) são marcadores relativamente mais novos; cada um deles possuem vantagens, limitações e diversas formas de aplicações (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; MELO et al., 2001; RODRIGUES et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2009; BARAKAT et al., 2010).

Um dos marcadores moleculares que vem sendo utilizado em diversos estudos ultimamente é o ISSR: algodão (Liu e Wendel, 2001), manjeriço (Aghaei et al., 2012), pimenta (Oliveira et al., 2013), dendê (Chagas et al., 2015); mostrando-se eficaz na detecção de polimorfismo, além de possuir baixo custo, ser abundante no genoma e reprodutível entre laboratórios (SANTANA et al., 2011).

Os marcadores ISSR são conhecidos por utilizarem um único *primer* desenhado com base nas sequências repetidas dos microssatélites que geram um grande número de fragmentos e são bastante utilizados em plantas e fungos (GUIMARÃES et al., 2009).

3.9. Determinação da diversidade genética

O conhecimento da diversidade genética em um grupo de plantas é de grande importância para os programas de melhoramento. Com as análises dos genitores é possível identificar genótipos com as mais diversas capacidades de combinações híbridas e que apresentam maior heterozigose. Essas informações permitem realizar combinações de indivíduos que possam recuperar genótipos superiores em gerações segregantes os quais apresentam, em sua maioria, vasta variabilidade genética para seleção. Para isso é preciso que haja uma população-base para que, ao realizar-se a seleção, amplie-se a variabilidade genética e aumente a média para o caráter a ser selecionado (CARVALHO et al., 2003).

Estudos de diversidade genética têm sido feitos em diversas culturas pelo mundo, como mangaba (COSTA et al., 2011), soja (ALMEIDA et al., 2011), batata-doce (MARTINS et al., 2012), feijão-de-corda (SILVA et al., 2012), milho (ROTÍLI et al., 2012), pimenta (ALVARES et al., 2012), algodão (RESENDE et al., 2014), videiras (BATISTA et al., 2015), entre outras.

Trabalhos que utilizam a análise da diversidade genética por meio de técnicas multivariadas têm oferecido grandes contribuições na avaliação e indicação de genitores, por proporcionar a avaliação da população em estudo com base em todas as características simultaneamente (SANTOS, 2000).

Para a quantificação do grau de semelhança entre um grupo de acessos, com base em um conjunto de características, é usual a utilização de estimativas de similaridade ou dissimilaridade resultando em uma matriz de ordem “n”, sendo “n” o número de genótipos. Porém esses valores por si só não proporcionam facilidade de interpretação, principalmente quando o número de genótipos em estudo é muito alto, sendo então necessária a utilização de métodos de agrupamento e/ou projeção gráfica (CRUZ et al., 2011).

Entre os métodos estatísticos de análise multivariada utilizados comumente em trabalhos de divergência genética, podemos citar os métodos de projeção gráfica ou de agrupamento. As análises de projeção gráfica tem como princípio a dispersão dos genótipos em um plano bi ou tridimensional onde as coordenadas são obtidas a partir das medidas de dissimilaridade. A análise de agrupamento é uma técnica que consegue separar e reunir objetos de estudo em grupos, onde esses objetos sejam os mais semelhantes possíveis dentro do mesmo grupo, enquanto que os grupos formados sejam distintos entre si, sendo os mais utilizados os métodos hierárquicos e os de otimização (CRUZ et al., 2011).

Os métodos hierárquicos tem como princípio a obtenção do dendograma onde há a formação de uma árvore de ramos conectados. Um dos métodos de agrupamento mais utilizado no melhoramento vegetal é o UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), que tem por base a ligação média não ponderada entre os grupos. O método de Tocher é a técnica de otimização mais utilizada que toma como base o critério de que a média das medidas de distância dentro de cada grupo deve ser menor que as distâncias médias entre grupos (RESENDE, 2007; CRUZ et al., 2012).

Para a obtenção das matrizes de dissimilaridade que são utilizadas na formação do dendograma existem diversos métodos de quantificação, que vão depender da natureza dos dados; sejam eles, quantitativos, multicategóricos ou moleculares, por exemplo, desta forma podemos citar: distância de Mahalanobis, distância euclidiana, Jaccard, coeficiente de

coincidência simples, Gower, entre outros. O coeficiente de Gower, por exemplo, pode ser aplicado simultaneamente aos três tipos de características; binárias, multicategóricas e quantitativas; já o coeficiente de Jaccard é usado em análises moleculares, com variáveis binárias, codificadas como 0 na ausência e 1 na presença de amplicons, sendo a distância de Mahalanobis e distância Euclidiana medidas de dissimilaridade para dados quantitativos (CRUZ et al., 2011).

O objetivo na caracterização do sisal é acessar os genótipos que tenham características desejáveis e que permitam, sobretudo, o melhor conhecimento do germoplasma para que este possa ser usado em futuros cruzamentos, tendo como foco o aparecimento de materiais superiores, principalmente na transferência de genes que expressam características favoráveis visando a ampliação na produção de fibras, além de fibras de maior comprimento, resistentes ao dobramento das folhas e ainda com maior número de folhas, o que favorece a produção final não só de fibras, como de mucilagem.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Recursos genéticos e condução do experimento

Trinta e sete acessos de sisal, pertencentes à Coleção Ativa de Germoplasma da Embrapa Algodão foram usados para o estudo de divergência genética (Tabela 1). As plantas são mantidas desde 2009 no campo experimental da Embrapa Algodão localizado em Monteiro-PB (altitude: 599 m, latitude: 07° 53' 22" S e longitude: 37° 07' 40" W).

Tabela 1. Relação dos acessos de sisal para as avaliações morfoagronômicas e moleculares.

Acessos	Identificação	Acessos	Identificação
SS-01	Híbrido 11648 (<i>A. amaniensis</i> x <i>A. angustifolia</i>)	SS-20	Sisalana Tanzânia
SS-02	Híbrido 400 folhas	SS-21	Mutante Paraíba
SS-03	Cabinho	SS-22	IAC 0101
SS-04	IAC 034	SS-23	IAC 84193
SS-05	Híbrido RN	SS-24	Mutante Bahia
SS-06	Híbrido Quênia	SS-25	IAC 84003
SS-07	Agave folcloydes	SS-26	IAC 84051
SS-08	Sisal do tipo tatuí	SS-27	IAC 00200
SS-09	Sisal com espinhos nas bordas	SS-28	IAC 0067
SS-10	Sisalana de Valente/BA	SS-29	IAC 84001/4
SS-11	Sisal Híbrido, Teixeira/PB	SS-30	IAC 84005
SS-12	Híbrido de Imaculada/PB	SS-31	IAC 0056
SS-13	Sisalana ornamental	SS-32	84001/2
SS-14	Tatuí 3	SS-33	IAC 84-019
SS-15	Tatuí 4	SS-34	IAC 840096
SS-16	Mutante 1	SS-35	IAC 0097
SS-17	Hoxa México	SS-36	IAC 0069
SS-18	Tatuí 1	SS-37	Híbrido de Itaporanga
SS-19	Tatuí 2		

O experimento de campo foi conduzido no período compreendido entre os meses de setembro de 2015 e março de 2016 com precipitação nesse período variando de 0 a 140.8 mm (Tabela 2). O solo da área experimental foi identificado como Luvissole (IBGE, 2007). Todo o experimento foi realizado em condição de sequeiro.

Os ensaios moleculares foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão, situada na cidade de Campina Grande-PB, Brasil.

Tabela 2. Dados da precipitação anual no Município de Monteiro/PB nos anos de 2015 e 2016.

Ano/Meses	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
(2015)	0,8	61,8	81,4	108,2	8,4	65,1	70,2	8,2	0	0	0	122,6
(2016)	140,8	56,6	147	13,2	56,8	0,6						

Fonte: INMET e Embrapa Algodão. Disponível em: < <http://www.inmet.gov.br/portal/> >.

4.2. Caracterização morfoagronômica

O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições. Os acessos foram plantados em fileiras de 5 m e espaçamento entre linhas de 3 m, com 6 plantas por fileira. Os tratos culturais foram frequentemente realizados.

As avaliações foram feitas utilizando-se as seguintes características: número de folhas (NFO), altura da planta (ALT), comprimento de folha (CFO), massa da folha (MFO), massa da mucilagem fresca (MMF), massa da mucilagem seca (MMS), massa da fibra fresca (MFIF), massa da fibra seca (MFIS), comprimento da fibra (CFI), presença de espinhos nas bordas (PEB), perfilhamento (PF) e resistência ao dobramento (RD).

A altura da planta (cm) foi determinada com auxílio de uma trena, posicionada da base da planta ao ápice da primeira folha completamente expandida. O número de folhas foi determinado por meio de contagem simples, através de percepção visual. O comprimento de folhas (cm) foi medido a partir do ponto de origem das folhas até a ponta, com auxílio de uma trena.

Para obterem-se a massa (kg) das folhas utilizou-se uma balança de precisão. Para a massa da mucilagem e fibra fresca foi realizado, primeiramente, o desfibramento das folhas as quais passaram pela máquina Paraibana realizando-se a separação da fibra e da mucilagem que foram pesadas e postas para secar em casa de vegetação durante 15 dias, para em seguida obter-se as massas de mucilagem e fibra seca. O comprimento das fibras secas (cm) foi aferido, tendo como base as fibras principais, utilizando-se fita métrica. Os caracteres qualitativos, presença de espinhos nas bordas, perfilhamento e resistência ao dobramento das folhas foram avaliados adicionando-se valores as características observadas em campo, de acordo com a tabela 3.

Tabela 3: Escala de notas atribuídas aos caracteres qualitativos para trinta e sete acessos da Coleção Ativa de Germoplasma de sisal em Monteiro-PB, 2016.

PF	PEB	RD
Sem perfilho = 1	Com espinhos = 1	Resistente = 1
1 a 2 perfilhos = 2	Sem espinhos = 2	Sem resistência = 2
3 a 4 perfilhos = 3		
≥ 5 perfilhos = 4		

(PF)= Perfilhamento; (PEB)= Presença de espinhos nas bordas; (RD)= Resistência ao dobramento das folhas.

Um dado importante para o uso de fibras naturais como o sisal é ter o conhecimento do comprimento dessas fibras (CFI) para que, em futuros programas de melhoramento, essa informação seja levada em consideração ao realizar a hibridação dos acessos, tendo em vista que materiais de fibra longa ou extralonga aliados a uma boa resistência, por exemplo, tem sido o desejo de muitos melhoristas para a cultura. Assim, na caracterização dos acessos, utilizou-se como referência o decreto nº 31.329 de 22 de agosto de 1952, que classifica e regulamenta as fibras de sisal no Brasil estabelecendo quatro classes de acordo com o comprimento (Tabela 3) (CÂMARA DOS DEPUTADOS, 1952).

Tabela 4. Classificação das fibras de sisal quanto às classes e comprimento, de acordo com o decreto nº 31.329 de 22 de agosto de 1952.

Classes	Comprimento (cm)
Extralonga	≥ 111
Longa	91 a 110
Média	71 a 90
Curta	45 a 70

Fonte: Legislação Informatizada - Decreto nº 31.329, de 22 de Agosto de 1952.

4.3. Extração de DNA genômico

O DNA genômico de folhas de sisal foi extraído de acordo com o método de CTAB (Ferreira e Grattapaglia, 1998) com modificações. Amostras de tecido foliar foram coletadas e armazenadas em freezer a -80°C. Posteriormente 200 mg de tecido foram colocados em

microtubos de 2,0 mL com uma esfera de aço (6 mm) e adicionado 1 mL de tampão de extração (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 0,2 M, Tris-HCl 0,1 M pH 8,0; PVP 2% e β -mercaptoetanol 0,2%). Os tubos foram colocados em Mini-Beadbeater por 3 minutos para maceração dos tecidos vegetais, em seguida submetidos a 65°C em banho-maria por 30 minutos, com homogeneização a cada 5 minutos. Depois de resfriados a temperatura ambiente, as amostras foram submetidas à centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 1,5 mL, com os cuidados necessários para evitar contaminação entre as fases e adicionado 600 μ L de CIA (Clorofórmio: Álcool isoamílico, 24:1, v/v), misturados gentilmente por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para tubos novos previamente identificados, adicionados 600 μ L de isopropanol gelado e misturados lentamente, por inversão dos tubos. As amostras foram submetidas à nova centrifugação por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Ao sedimento foi adicionado 1 mL de etanol 70% (gelado), centrifugado por 5 minutos e descartado o sobrenadante, repetiu-se o procedimento com 1 mL de etanol 95% (gelado). Por fim, o sedimento foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 200 μ L de H₂O ultrapura autoclavada. Em seguida foi adicionado 4 μ L de RNase (10 mg/mL) e incubado em banho-maria à 37°C por 30 minutos, passado esse período o DNA foi novamente precipitado com CIA (Clorofórmio: Álcool isoamílico, 24:1, v/v), centrifugado e ressuspendido em 200 μ L de H₂O ultrapura autoclavada e armazenado a -20°C.

4.4. PCR-ISSR (Inter Sample sequence repeat)

As reações foram conduzidas utilizando-se 6 μ L de DNA genômico (10 η g/ μ L), 2,5 μ L de tampão de reação (10X), 2,0 μ L de MgCl₂ (25 mMol.L⁻¹), 0,5 μ L dNTPs (10 μ Mol.L⁻¹); 2,0 μ L oligonucleotídeo (Tabela 5) (10 mMol.L⁻¹) e 0,2 μ L Taq DNA polimerase (5 U. μ L⁻¹) completando-se para um volume final de 25,0 μ L com H₂O ultrapura autoclavada. As reações foram conduzidas em um termociclador (marca *Amplitherm Thermal Cyclers*) com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C/5 min, 40 ciclos de 95°C/1 min, 50°C/1 min e 30 seg e 72°C/2 min. Uma extensão final foi adicionada a 72°C/7 min. Ao término das reações, as amostras foram mantidas a 4°C para posterior uso.

Aos produtos das reações foram adicionados 2,5 μ L de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40%) e 2,5 μ L de SYBR[®] *Gold* (Invitrogen), sendo posteriormente separados em eletroforese de gel de agarose (2,5%), usando o marcador Leader (100 e 50 pb, *Ludwig Biotec*) como padrão e fotodocumentados.

Tabela 5. Sequência dos oligonucleotídeos ISSR desenvolvidos pelo laboratório de Biotecnologia da Universidade da Columbia Britânica (UBC).

Iniciador	Sequência (5' → 3')
UBC 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG
UBC 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA
UBC 813	CTC TCT CTC TCT CTC TT
UBC 814	CTC TCT CTC TCT CTC TA
UBC 816	CAC ACA CAC ACA CAC AT
UBC 817	CAC ACA CAC ACA CAC AA
UBC 818	CAC ACA CAC ACA CAC AG
UBC 821	GTG TGT GTG TGT GTG TT
UBC 822	TCT CTC TCT CTC TCT CA
UBC 823	TCT CTC TCT CTC TCT CC
UBC 824	TCT CTC TCT CTC TCT CG
UBC 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT
UBC 826	ACA CAC ACA CAC ACA CC
UBC 827	ACA CAC ACA CAC ACA CG
UBC 828	TGT GTG TGT GTG TGT GA
UBC 830	TGT GTG TGT GTG TGT GG
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
UBC 845	CTC TCT CTC TCT CTC TRG
UBC 846	CAC ACA CAC ACA CAC ART
UBC 851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG
UBC 853	TCT CTC TCT CTC TCT CRT
UBC 855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT
UBC 858	TGT GTG TGT GTG TGT GRT
UBC 859	TGT GTG TGT GTG TGT GRC
UBC 860	TGT GTG TGT GTG TGT GRA

UBC 881	GGG TGG GGT GGG GTG
UBC 884	HBH AGA GAG AGA GAG AG
UBC 885	BHB GAG AGA GAG AGA GA
UBC 888	BDB CAC ACA CAC ACA CA

4.5. Análise estatística

Os dados foram interpretados de acordo com a natureza dos mesmos, sendo eles quali-quantitativos para os dados morfoagronômicos e qualitativos binários para os marcadores moleculares. Os dados agronômicos foram submetidos à análise de variância pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade para a estimação dos componentes de variância e dos parâmetros genéticos. Em seguida, realizou-se a comparação de médias para as características número de folhas (NFO); altura da planta (ALT); comprimento de folha (CFO); massa da folha (MFO); massa da mucilagem fresca (MMF); massa da mucilagem seca (MMS); massa da fibra fresca (MFIF); massa da fibra seca (MFIS) e comprimento de fibra (CFI) por meio do teste de Scott-Knott.

As medidas de dissimilaridade foram obtidas por meio da distância de Gower para os dados morfoagronômicos de acordo com a seguinte expressão:

$$s_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^p w_{ijk} \cdot s_{ijk}}{\sum_{k=1}^p w_{ijk}}$$

Onde: K é o número de variáveis ($k = 1, 2, \dots, p$); i e j , dois indivíduos quaisquer que representam o genótipo; W_{ijk} é um peso dado a comparação ijk , sendo 1 para comparações válidas e 0 para comparações inválidas, no caso do valor da variável estar ausente em um ou ambos genótipos; S_{ijk} é a contribuição da variável k na similaridade entre os genótipos i e j , possuindo valores entre 0 e 1 (CRUZ et al., 2011).

A análise dos marcadores dominantes foi realizada com a finalidade de estimar a dissimilaridade genética entre os acessos, para tanto os amplicons foram analisados como presentes (1) ou ausentes (0) para cada acesso. De posse desses dados foi construída uma

matriz de 0 a 1 e a estimativa de similaridade genética (S_{ij}) entre cada par de acessos foi calculada pelo coeficiente de Jaccard e definido pela seguinte expressão:

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

Onde:

s_{ij} : similaridade genética entre o par de acessos i e j .

a: presença da banda em ambos os acessos (número de contagens de concordância do tipo 1 1);

b: presença da banda em i e ausência em j (número de discordância do tipo 1 0);

c: ausência da banda em i e presença em j (número de contagens de discordância do tipo 0 1).

Este coeficiente foi escolhido porque compara o número de presenças de bandas comuns e o número total de bandas envolvidas, excluindo o número de ausências conjuntas. Segundo Clifford e Stephenson (1975), a escolha dos coeficientes que estão restritos ao intervalo [0, 1] é mais adequada, pois índices que tendem ao infinito são sensíveis a pequenas mudanças, especialmente em a .

Para gerar a matriz utilizada no agrupamento foi adotado o complemento aritmético ($1 - S_{ij}$) para a obtenção da matriz de dissimilaridade.

4.6. Análise conjunta dos dados

A análise de divergência genética entre os acessos foi feita a partir da soma das matrizes geradas separadamente pelos dados morfoagronômicas e moleculares. Os valores de dissimilaridade de cada matriz foram padronizados por meio da expressão:

$$d_{pij} = \frac{d_{ij}}{\sigma_d}$$

Foi feito também, a correlação entre as matrizes que se destina ao cálculo da correlação entre as medidas de dissimilaridade fornecidas entre pares de matrizes obtendo-se a significância pelos testes de t e Mentel (CRUZ, 2008).

Depois de obtida a matriz, foi feito o agrupamento pelo método hierárquico UPGMA e de otimização de Tocher (CRUZ, 2008). Todos os procedimentos estatísticos foram realizados pelo programa GENES, versão 2016.6.0 (CRUZ, 2013).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise de variância para as nove características agronômicas: número de folhas, altura de planta, comprimento de folha, massa da folha, massa da mucilagem fresca, massa da mucilagem seca, massa da fibra fresca, massa da fibra seca e comprimento de fibra. Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,01$) em todas as características avaliadas (Tabela 6). Sendo assim, pode-se inferir que há variabilidade significativa entre os acessos avaliados para as características em estudo.

Esses resultados assemelham-se com os de Rojas et al. (2007), que ao estudarem seis populações de Agave “Manso” para determinar a diversidade genética dentro e entre populações utilizando marcadores moleculares Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) e algumas variáveis morfológicas e agronômicas, também observaram diferença significativa ($P < 0,01$) para altura de planta, número de folhas, largura de folhas, comprimento de folhas, número de espinhos laterais e comprimento da coluna principal.

Em relação aos coeficientes de variação, observou-se que para a maioria das características eles mantiveram-se dentro do que é considerado aceitável, ou seja, valores entre 10 a 20%, indicando a homogeneidade dos dados (SANTOS et al., 2003). O menor foi de 6,48% para comprimento de fibra (CFI) e os maiores percentuais observados foram de 26,12% e 31,54% para as massas da mucilagem fresca (MMF) e seca (MMS), indicando que são caracteres quantitativos, muito complexos, controlados por vários genes, que normalmente sofrem alta influência ambiental. Portanto, esses CVs são considerados aceitáveis.

Entre os componentes de variância, sabe-se que a variância fenotípica (σ_p^2) é igual à variância genotípica (σ_g^2) mais a variância ambiental (σ_e^2) (COELHO E BARBIN, 2006), neste estudo, de acordo com a Tabela 6, a variância genotípica foi a de maior contribuição para as nove características avaliadas indicando a expressiva variabilidade genética presente na população.

Silva e Beltrão (1999) relataram que uma das maiores dificuldades no melhoramento genético do sisal é a falta de conhecimento sobre a herdabilidade (h^2) das características de importância econômica da planta, especialmente aquelas relacionadas à produção e características de fibra.

Considerando que a herdabilidade (h^2) é um coeficiente genético que expressa a relação entre a variância genotípica (σ_g^2) e a variância fenotípica (σ_p^2), ou seja, mede o nível de correspondência entre o valor fenotípico e o valor genético (COELHO E BARBIN, 2006),

houve alta h^2 (Tabela 5) para as características avaliadas (todas acima de 90%). Isso permite inferir que a seleção de plantas com base nas características estudadas pode ser muito eficiente, uma vez que quando a h^2 assume valores acima de 50% é passível de ganhos genéticos significativos (BUENO, 2006).

A variabilidade genética pode ser quantificada pelo coeficiente de variação genética (CVg), o qual expressa a magnitude da variação genética em relação à média do caráter (RESENDE, 1991). Neste estudo, todas as características apresentaram ótimos valores do coeficiente de variação genética (CVg), porém, digno de registro é o valor encontrado para massa da folha (76,19%) corroborando com a maior h^2 encontrada (98,93%); essa característica possui grande importância para o sisal, pois plantas que apresentam massa da folha elevada podem gerar grandes quantidades de fibra e mucilagem, matérias-primas largamente utilizadas em diversos setores da indústria sisaleira (SILVA e BELTRÃO, 1999); o que pode proporcionar um indicativo de potenciais melhorias genéticas com base nessa característica em especial para a população estudada. Possíveis cruzamentos com base no CVg das demais características também podem ser feitos, já que segundo Sebbenn et al. (1998) coeficientes de variação genética acima de 7% são considerados altos.

A razão CVg/CVe é tida como uma indicadora de variabilidade genética na população e indicadora do sucesso de seleção (VENCOVSKI e BARRIGA, 1992). De acordo com os dados da Tabela 6, todas as características apresentaram valores superiores a 1,0. As características que apresentaram as maiores razões CVg/CVe foram: massa da folha (4,40), a qual obteve os melhores valores também para h^2 e CVg, já mencionados; seguida de massa da fibra fresca (3,54) e comprimento de fibra (3,12). Mistro et al. (2007) afirmaram que quando a razão CVg/CVe resulta ser igual ou maior do que 1,0 a situação é favorável à seleção genética.

Resultados parecidos foram encontrados por Cunha et al. (2009) ao avaliar as estimativas de parâmetros genéticos para caracteres produtivos de sorgo forrageiro, uma planta monocotiledônea assim como o *Agave*, observando-se valores da razão CVg/CVe superiores a 1,0 em todas as características com exceção da sobrevivência da planta (0,79).

No agrupamento das médias dos acessos realizado pelo teste de Scott-knott, ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 7) observa-se variabilidade para todas as características agronômicas, corroborando com a análise de variância.

As características altura, massa da mucilagem fresca e seca e massa da fibra seca e fresca revelaram maior variabilidade entre os acessos e formaram sete grupos diferentes. Os acessos IAC 84193, 840096, 00200, 84051 são as plantas mais baixas da coleção e os acessos

Tatuí 1, 3 e 4 as mais altas. Os acessos IAC 0069, 0097, 840096, 84193 e sisalana ornamental são os que produzem menor massa da mucilagem fresca e os acessos Tatuí 1 e 4 são os que mais produzem. O acesso Tatuí 4 é o que mais produz massa de mucilagem seca e os IAC 84193, 840096, 0069, 0097 e sisalana ornamental são os de menor produção de mucilagem seca. Para massa de fibra fresca, os acessos Tatuí 1 e 4 são os que mais produzem, enquanto que os acessos IAC 0069, sisalana ornamental, híbrido de Itaporanga, híbrido 11648 e IAC 840096 são os de menor produção. Em relação à massa de fibra seca, o acesso Tatuí 4 é o que apresenta a maior produção e os IAC 840096, 84193, 0096 e sisalana ornamental são os que menos produzem (Tabela 7).

Já para as características número de folhas e comprimento de folhas os acessos se dividiram em cinco grupos. Os híbridos 400 folhas, 11648, Imaculada/PB, RN e Quênia foram os que apresentaram maior número de folhas em média e os IAC 84193, Tatuí 2 e tipo Tatuí foram os acessos com menor número de folhas; para comprimento de folha, os acessos Cabinho, Tatuí 4, híbrido de Imaculada/PB, Tatuí 1, Tatuí 3, híbrido Quênia e *A. foulcloydes* foram os que apresentaram maior comprimento e o acesso IAC84193 foi o que apresentou o menor comprimento. As características massa da folha e comprimento de fibra formaram oito e nove grupos, respectivamente. O acesso Tatuí 4 é o que apresenta maior massa de folha e os acessos IAC 0097, 840096, 84193, 0069 e sisalana ornamental são os de menores massas; em relação ao comprimento de fibras, os acessos Tatuí 4 e 3 são os que apresentam os maiores comprimentos e os acessos IAC 84051, 0069, 840096,84193 e sisalana ornamental são os de menores comprimentos (Tabela 7).

Tendo como base as médias dessas características, é possível, por exemplo, estimar os acessos que possuem as características de maior interesse, o que facilita a escolha dos genitores para hibridação em um programa de melhoramento.

Tabela 6. Resumo da análise de variância e parâmetros genéticos e ambientais obtidos para nove caracteres agronômicos avaliados em 37 acessos de sisal da Coleção Ativa de Germoplasma em Monteiro-PB, 2016.

Quadrados Médios										
F.V	GL	NFO	ALT	CFO	MFO	MMF	MMS	MFIF	MFIS	CFI
Acesso	36	1084,3**	3526,4**	1175,3**	489835,4**	157356,4**	1535,5**	4500,2**	359,26**	1503,55**
Resíduo	140	64,68	203,82	84,23	5228,37	3852,36	78,42	73,78	9,10	31,65
Média	176	39	128,17	82,46	418,07	237,59	28,07	49,28	17,07	86,72
CV (%)		20,7	11,13	11,12	17,29	26,12	31,54	17,42	17,66	6,48
² _p		227,06	738,42	246,11	102570,87	32950,22	321,54	942,35	75,22	314,84
² _e		13,54	42,68	17,63	1094,81	806,67	16,42	15,45	1,90	6,62
² _g		213,51	695,74	228,47	101476,05	32143,54	305,12	926,9	73,32	308,21
h² (%)		94,03	94,22	92,83	98,93	97,55	94,89	98,36	97,46	97,89
CV_g (%)		37,61	20,57	18,32	76,19	75,45	62,2	61,77	50,14	20,24
Razão CV_g/CV_e		1,81	1,84	1,64	4,40	2,88	1,97	3,54	2,83	3,12

**Significativo pelo teste de F (P<0,01). Número de folhas (NFO); altura da planta (ALT); comprimento de folha (CFO); massa da folha (MFO); massa da mucilagem fresca (MMF); massa da mucilagem seca (MMS); massa da fibra fresca (MFIF); massa da fibra seca (MFIS); comprimento de fibra (CFI). Variância fenotípica (²_p); variância ambiental (²_e); variância genotípica (²_g); herdabilidade (h² %); coeficiente de variação genético (CV_g %).

Tabela 7. Comparação de médias para as características agronômicas: número de folhas (NFO); altura da planta (ALT); comprimento de folha (CFO); massa da folha (MFO); massa da mucilagem fresca (MMF); massa da mucilagem seca (MMS); massa da fibra fresca (MFIF); massa da fibra seca (MFIS) e comprimento de fibra (CFI) de 37 acessos Coleção Ativa de Germoplasma de sisal em Monteiro-PB, 2016.

Acessos	NFO	ALT	CFO	MFO	MMF	MMS	MFIF	MFIS	CFI
01	69,3 a*	104,8 f	77,1 c	283,6 g	220,4 e	26,8 e	22,5 g	10,6 f	76,5 g
02	75,6 a	151,1 c	89,1 b	304,6 g	199,3 e	25,2 e	31,5 f	10,6 f	84,5 f
03	34,6 c	170 b	111,2 a	604,1 d	317,3 d	38,5 d	79,7 c	28,2 c	109,8 c
04	36 c	133,3 d	86,5 b	306,3 g	178,5 f	19,9 f	66,4 d	19 d	91,3 e
05	65 a	124,2 e	84,7 b	306,6 g	168,5 f	23,1 e	31,7 f	18,8 e	82,1 f
06	62,8 a	147 c	104,9 a	428,5 f	162,1 f	20,1 f	59,1 d	15,2 e	77,5 g
07	33,3 c	162,5 b	97,9 a	686,9 d	392,3 c	47,5 c	80,1 c	27,3 c	109,5 c
08	17,3 e	117,1 e	67,2 d	895,5 c	477,2 b	51,3 c	63,8 d	18,5 d	99,5 d
09	27,8 d	152 c	89,9 b	303,1 g	132,9 f	24,3 e	35,8 e	14 e	90,7 e
10	29,3 d	112 e	70,6 c	318,6 g	230,7 e	25,9 e	27,3 f	11,4 f	88,5 e
11	57,2 b	126,6 e	91,9 b	276 g	196 e	18,6 f	31,2 f	11,4 f	74,6 g
12	66,3 a	145,6 c	106 a	392,2 f	160,7 f	21,6 f	31,2 f	15 e	89,8 e
13	25 d	98,5 f	61,7 d	135,6 i	83,7 g	12,2 g	19,5 g	6,8 g	61,1 h
14	27 d	183,5 a	105,2 a	855,6 c	479,8 b	47,6 c	107,6 b	29,3 c	131,2 a
15	33,2 c	187,8 a	110,5 a	1588,2 a	904,1 a	92,4 a	146,5 a	45,5 a	132,8 a
16	38 c	149,2 c	93,6 b	521,9 e	269,6 e	30,9 d	45,5 e	20,5 d	96,1 e
17	35 c	135,3 d	85,1 b	364 f	200,6 e	25,3 e	41,2 e	17 d	88,3 e
18	32 c	179 a	105,5 a	1419,6 b	853,5 a	82,1 b	142,1 a	39,1 b	122,7 b
19	19,5 e	153 c	86,2 b	670,1 d	322,2 d	38,3 d	102,5 b	28,5 c	112,1 c
20	49,5 b	133,5 d	91,5 b	342,3 f	147,2 f	18,3 f	29,6 f	13,6 e	82,6 f
21	26,8 d	124,8 e	75,8 c	357,8 f	209,4 e	21,6 f	38,7 e	17,1 d	86 f
22	27,6 d	106,6 f	67,1 d	204,6 h	140,7 f	15,8 f	45,8 e	10,8 f	73,1 g
23	19,6 e	80,4 g	50 e	115,2 i	82,8 g	8,4 g	34,9 e	6,9 g	58,5 h
24	31,1 c	133,5 d	82,3 b	409,5 f	179,7 f	17,3 f	41,1 e	18,5 d	87,1 e
25	26 d	121,5 e	73,7 c	274,5 g	243,3 e	27,6 e	46,3 e	17,3 d	94,5 e
26	34,8 c	94,6 g	64,7 d	191,1 h	152,6 f	20,9 f	30 f	11,7 f	65,8 h
27	29 d	93,2 g	61,1 d	267 g	142,2 f	18,5 f	42,8 e	16,1 e	74,1 g
28	44 c	129 e	86,5 b	299,5 g	230,4 e	33,9 d	35,7 e	15,9 e	90,5 e
29	38 c	104 f	71 c	338,9 f	190,7 e	19,8 f	29,8 f	11,6 f	83 f
30	50,6 b	134,4 d	92,5 b	265,1 g	229,7 e	44,8 c	42,3 e	16,7 d	79,6 f
31	36 c	98,8 f	67,4 d	374,3 f	121,1 f	16,5 f	30,9 f	9,8 f	73,5 g
32	38 c	104 f	71 c	218,4 h	115,4 f	16,6 f	32,6 f	13,4 e	70,1 g
33	44,3 c	107,5 f	75,9 c	241,3 h	153,2 f	23,9 e	69,1 d	27,1 c	88 e
34	33,3 c	89 g	61,1 d	126,6 i	65 g	8,5 g	23,2 g	7,9 g	60,6 h
35	28,4 d	105,8 f	67,1 d	140,8 i	59,4 g	9,3 g	34,7 e	12,8 f	73,4 g
36	30 d	101 f	65,5 d	110,3 i	57 g	9,2 g	13,9 g	5,4 g	64,2 h
37	51 b	126,7 e	88,8 b	293,2 g	260,7 e	22 f	22,1 g	9,9 f	76,5 g
Média	39	128,17	82,46	418,07	237,59	28,07	49,28	17,07	86,72

*Acessos (Tabela 1) seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Na estimativa realizada por marcadores moleculares foi encontrada alta taxa de polimorfismo entre os acessos de sisal avaliados, estando de acordo com a variabilidade encontrada na análise de variância. Dos trinta oligonucleotídeos testados para realizar a genotipagem dos 37 acessos, dez foram utilizados permitindo a obtenção de 123 fragmentos que apresentaram taxa de polimorfismo de 100%; a quantidade de bandas por oligonucleotídeos geradas variou entre 8 (UBC 824) e 19 (UBC 808) (Tabela 8).

Neste estudo, a alta média de fragmentos por iniciador e a ausência de iniciadores monomórficos confirmaram a grande variabilidade genética dos acessos de sisal avaliados e, também, mostrou a validação dos oligonucleotídeos ISSR testados, os quais poderão direcionar o programa de conservação, manejo e melhoramento da cultura. A Figura 4 ilustra o padrão eletroforético obtido pelo oligonucleotídeo UBC 812.

Tabela 8. Bandas geradas e polimórficas dos oligonucleotídeos utilizados na caracterização dos acessos de sisal.

Oligonucleotídeos	Bandas geradas	Bandas Polimórficas	Taxa de Polimorfismo (%)
UBC 808	19	19	100
UBC 809	15	15	100
UBC 812	11	11	100
UBC 823	11	11	100
UBC 824	8	8	100
UBC 825	13	13	100
UBC 827	11	11	100
UBC 830	12	12	100
UBC 853	12	12	100
UBC 881	11	11	100
Total	123	123	

A reprodução de *Agave* tem sido feita há anos pela propagação assexuada intensiva e praticamente quase nenhuma reprodução sexuada, o que levou a uma redução da variabilidade genética e aumento da susceptibilidade a pragas e doenças em plantações comerciais (GIL-VEGA et al., 2001). Porém, um estudo realizado por Abraham-Juárez et al. (2009), analisou a variabilidade genética em três formas de reprodução de *A. tequilana*, utilizando marcadores moleculares AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e encontraram cerca de 86% de locos polimórficos em plantas reproduzidas de forma assexuada, e 90% de polimorfismo em plantas reproduzidas por semente, indicando que plantas de *A. tequilana* podem ter alta variabilidade genética mesmo sendo propagadas por clones.

Na literatura, existem diversos trabalhos que relatam o uso de marcadores dominantes, como o ISSR, e que consideram a taxa de polimorfismo como medida de diversidade genética (CHEN et al., 2006; CARVALHO et al., 2012; LORENZONE et al., 2014; LIMA et al., 2015).

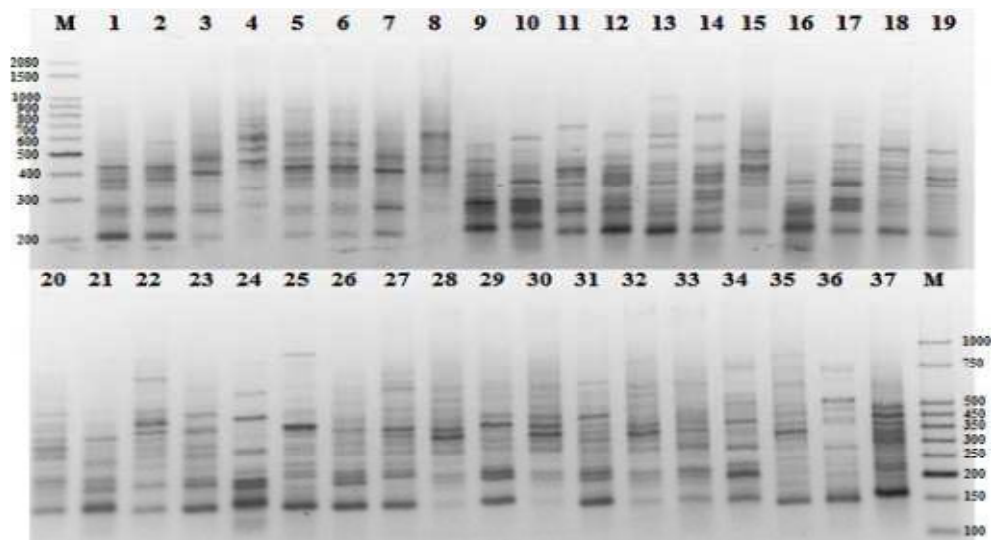


Figura 4: Padrão de bandas obtidas pelo oligonucleotídeo UBC 812 para os 37 acessos de sisal (Tabela 1). M – Marcador 100 e 50 pb (*Ludwig Biotec*).

Neste estudo, onde as plantas foram propagadas de forma assexuada, todos os marcadores encontrados foram polimórficos. Infante et al. (2006) ao estudarem algumas espécies de *Agave*, utilizando marcadores moleculares ISTR (Inverse Sequence Tagged Repeat) e AFLP, observaram que a comparação dos padrões de bandas entre plantas mãe e plantas filhas derivadas de rizoma mostraram que a variabilidade genética também pode ser gerada pela reprodução assexuada nestas espécies e concluíram que a diversidade genética encontrada nessas plantas podem ser oriundas de mutações somáticas, uma vez que a reprodução é feita com bulbilhos ou rebentos e os meristemas se dividem mitoticamente, desta forma, esta importante fonte de variabilidade pode estar ligada a elementos transponíveis, ou seja, conjuntos de segmentos lineares de DNA, que são capazes de mudar de posição dentro do genoma.

Foi feito a análise de agrupamento por meio da soma das matrizes, geradas pelos dados morfoagronômicos e moleculares, os valores de dissimilaridade de cada matriz foram padronizados e foi obtida uma nova matriz de dissimilaridade pela qual foi constituído o agrupamento dos 37 acessos de sisal pelo método de otimização de Tocher e UPGMA.

No método de Tocher ocorreu a formação de 13 grupos (Tabela 9) com o grupo 1 formado por 40,5% dos acessos. Os acessos mutante 1 (Grupo 8), IAC 034 (Grupo 9), Mutante Bahia (Grupo 10), Tatuí 2 (Grupo 11), IAC 84193 (Grupo 12), Sisal do tipo Tatuí (Grupo 13) formaram grupos únicos. Os demais acessos formaram 6 grupos. O grupo 1 reuniu a maior parte dos acessos, entre eles o híbrido 11648, considerado o ideal para as condições do Nordeste brasileiro (SILVA e BELTRÃO, 1999). Este grupo apresenta-se com plantas de altura média e com alguns acessos apresentando um elevado número de folhas, a exemplo dos híbridos RN, Quênia e 400 folhas. Os acessos desse grupo apresentam perfilhamento, exceto o IAC 84-019, além de apresentarem-se com resistência ao dobramento das folhas, comprimento de fibras médio (Tabela 4) e não possuem espinhos nas bordas, o que facilita a colheita do material.

No grupo 2, reuniram-se os acessos Cabinho e Agave folcloydes; ambos são materiais que possuem espinhos nas bordas e apresentam perfilhamento, porém, o Agave folcloydes possui menor resistência ao dobramento das folhas do que o Cabinho; caracterizam-se ainda por serem materiais de altura elevada e com fibras longas (Tabela 4). O grupo 3 reuniu os acessos que se destacam por possuírem comprimento de fibra média e curta (Tabela 4), e as menores massas de folha, mucilagem fresca e seca, além de todos serem materiais resistentes ao dobramento da folha. No grupo 4, formado por apenas 2 acessos os quais caracterizam-se, principalmente, por possuírem comprimento de fibra médio (Tabela 4), serem resistentes ao dobramento das folhas e apresentarem perfilhos.

Tabela 9. Agrupamento dos acessos de sisal pelo método de otimização de Tocher, a partir dos dados morfoagronômicos e moleculares.

Grupos	Acessos
1	Híbrido RN, Híbrido Quênia, Híbrido 400 folhas, Híbrido 11648, IAC 84005, IAC 0067, 84001/2, Sisalana Tanzânia, IAC 0056, Híbrido Itaporanga, IAC 00200, Híbrido de Imaculada-PB, Hoxa México, IAC 84051, IAC 84-019
2	Cabinho, Agave Folcloydes
3	IAC 840096, IAC 0069, IAC 0097, Sisalana ornamental, IAC 0101
4	IAC 84003, IAC 84001/4
5	Tatuí 4, Tatuí 1, Tatuí 3
6	Sisalana de Valente-BA, Sisal híbrido de Teixeira-PB
7	Sisal com espinhos nas bordas, Mutante Paraíba

8	Mutante 1
9	IAC 034
10	Mutante Bahia
11	Tatuí 2
12	IAC 84193
13	Sisal do tipo Tatuí

O grupo 5, foi formado pelos acessos Tatuí 1, 3 e 4 os quais apresentam-se morfológicamente como materiais que possuem espinhos nas bordas e grande número de perfilhos, porém são pouco resistentes ao dobramento da folha, o que é uma característica importante tratando-se do sisal, pois disso depende a qualidade da fibra a ser extraída. Em contrapartida esses acessos foram os que apresentaram as maiores massas de folha, mucilagem fresca e seca, fibras fresca e seca (Tabela 7) e comprimento de fibras classificadas como extralongas (Tabela 4), além de serem as plantas mais altas da coleção, em média 183,4 cm (Tabela 7). Os grupos 6 e 7 possuem acessos com plantas altas (Tabela 7), comprimento de fibras médio (Tabela 4), possuem espinhos nas bordas e apresentaram perfilhamento, porém, os acessos do grupo 6 possuem resistência ao dobramento das folhas, o que não ocorre nos acessos do grupo 7.

Para a análise de agrupamento pelo método UPGMA, ao considerar-se um ponto de corte no percentual de divergência genética de 82%, houve a formação de doze grupos distintos, semelhante ao método de otimização de Tocher, em especial para os acessos mais divergentes: Tatuí 2 formou um só grupo assim como em Tocher; os acessos Tatuí 1, 3 e 4 formaram outro grupo; mutante 1 e mutante Bahia formaram grupos distintos; Cabinho e *A. folcloydes*, sisalana de Valente/BA e sisal híbrido de Teixeira formaram dois grupos (Figura 5).

Nos grupos I e II, predominam materiais de fibra longa a extralonga, a exemplo dos Tatuí 1, 2, 3 e 4 com fibras chegando a alcançar 1,32 cm (Tabela 7). Todos apresentam perfilhamento, espinhos nas bordas das folhas e a maioria não são resistentes ao dobramento das folhas. No grupo II, o acesso Tatuí 1 e 4 caracterizam-se ainda por possuírem as maiores massas de folha, mucilagens fresca e seca, massas de fibra seca e fresca e são as plantas mais altas nesse estudo.

Nos grupos III, IV, V, VI, VII e VIII predominam materiais que são resistentes ao dobramento das folhas; a maioria dos acessos também apresentam perfilhamento e

comprimento de fibras variando de média a curta (Tabela 4), além de serem plantas de altura mediana e baixas (Tabela 7); os acessos sisalana ornamental, sisalana de Valente-BA, IAC 84193, IAC 840096, IAC 0069 e IAC 84001/2 apresentam comprimento de fibras classificadas como curtas.

No grupo IX, a maioria dos acessos não possuem espinhos nas bordas e são materiais de fibras curtas e médias e comprimento de folhas variando de 61,1 cm (IAC 00200) a 1,06 cm (Híbrido de Imaculada/PB). Os acessos do grupo X e XI apresentam, principalmente, baixo número de folhas por planta, a exemplos dos acessos IAC 84193 com média de 19 folhas por planta e sisalana ornamental com 25 (Tabela 7). E por fim, o grupo XII, formado pelos híbridos RN, Quênia, 400 folhas e o 11648, são os acessos que possuem o maior número de folhas, a exemplo do híbrido 400 folhas com média de 75 folhas por planta e são plantas me medem acima de um metro (Tabela 7).

Santos et al. (2014) ao estudar esses mesmos acessos, porém utilizando a maioria das características morfológicas, encontrou resultados parecidos na análise de agrupamento pelo método UPGMA; o grupo IV do seu estudo, por exemplo, reuniu todos os acessos Tatuí e apresentaram em comum com nosso estudo a presença de espinhos nas bordas das folhas e a emissão de perfilhos.

Ainda de acordo com o dendograma, podemos observar que a menor dissimilaridade está entre o Híbrido RN e o Híbrido Quênia com 4,39 de distância genética, respectivamente, e que a maior dissimilaridade está entre esses mesmos acessos e o Tatuí 2 (11,34). É possível observar também que os acessos IAC apresentam uma menor distância entre si, o que pode indicar uma base genética estreita entre eles.

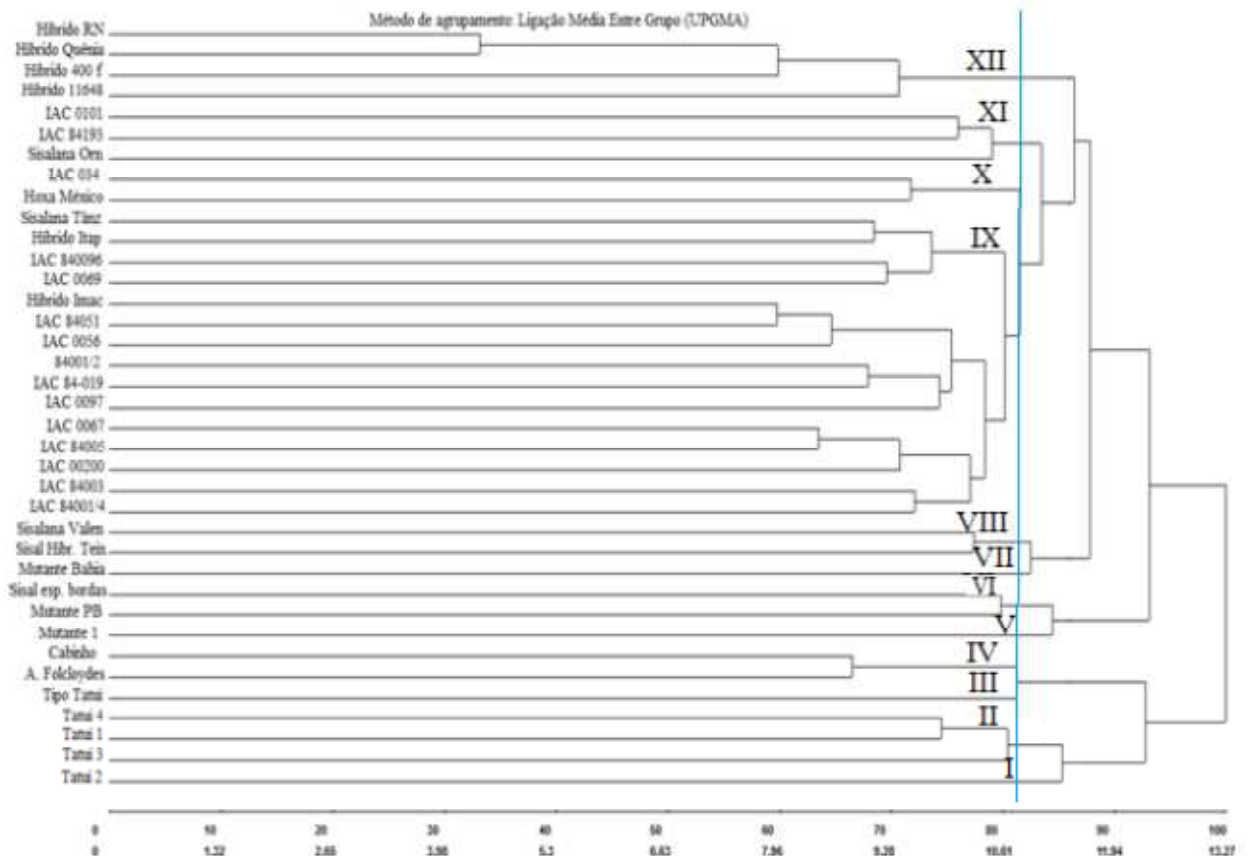


Figura 5. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA.

Uma das razões para o uso do método de agrupamento UPGMA é que este tende a gerar valores mais altos do coeficiente de correlação cofenética (CCC) (CRUZ et al., 2011). Neste estudo, o coeficiente de correlação cofenética foi de 0,77; o que permite inferir que os grupos de acessos formados podem ser considerados seguros, além de demonstrar um bom ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma obtido. Segundo Cruz e Carneiro (2003), a consistência do padrão de agrupamento pode ser feito a partir do coeficiente de correlação cofenética e que valores próximos a unidade indicam uma melhor representação do dendrograma.

Por meio do teste de correlação entre as matrizes, foram avaliados os dados morfoagronômicos e moleculares. Adotando-se os testes de probabilidade de t e de Mantel foi obtido o valor de 0,17, considerado baixo, porém foi significativo a 1% pelos dois testes. Desta forma, pode-se inferir que a correlação entre as matrizes foi significativa, refletindo a semelhança entre esses dois tipos de marcadores.

Os resultados obtidos neste estudo poderão subsidiar o programa de melhoramento da cultura a partir da identificação de materiais com características de interesse agrônomo para promover o desenvolvimento da espécie.

6. CONCLUSÕES

- Há variabilidade genética entre os acessos de sisal com base na análise de variância aplicada;
- Os marcadores ISSR são eficientes na avaliação da divergência genética na Coleção Ativa de Germoplasma de sisal;
- Os acessos IAC apresentaram a menor distância genética entre si, indicando uma possível base genética estreita;
- O híbrido Quênia e o híbrido RN foram identificados como os acessos mais similares, enquanto que o Tatuí 2 foi identificado como o mais divergente, sendo indicados para possíveis cruzamentos no programa de melhoramento genético da cultura.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM-JUÁREZ, M. J.; RAMÍREZ-MALAGÓN, R.; GIL-VEGA, K.; SIMPSON, J. ANÁLISIS AFLP DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN TRES FORMAS DE REPRODUCCIÓN DE *Agave tequilana*. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 32, n. 3, p. 171-175, 2009.
- ABREU, K. C. L. M. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no estado da Bahia**. 2010. 100 f. Tese (Doutorado) □ Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.
- AGHAEI, M.; DARVISHZADEH, R.; HASSANI, H. Molecular characterization and similarity relationships among iranian basil (*Ocimum basilicum* L.) accessions using inter simple sequence repeat markers. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 312-320, 2012.
- ALMEIDA, R. D.; PELUZIO, J. M.; AFFÉRRRI, F. S. Divergência genética entre cultivares de soja, sob condições de várzea irrigada, no sul do estado Tocantins. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 1, p. 108-115, 2011.
- ALVARENGA, E. R. J. Cultivo e aproveitamento do sisal (*Agave sisalana*). Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC). 2012. 33p. **Dossiê técnico**.
- ALVARES, R. C.; REIS, E. F.; PINTO, J. F. N. Genetic divergence in pepper genotypes from southwest Goiás. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 5, p. 498-506, 2012.
- ALVES, M. O; SANTIAGO, E. G; LIMA, A. R. M. **Diagnóstico socioeconômico do setor sisaleiro do Nordeste brasileiro**. 2005. 90 p. (Série documentos do ETENE, 04).
- APAEB. **Agave tequilana: Mexicanos querem produzir na região do sisal**. 2013. Disponível em: <<http://www.apaeb.com.br/portal/index.php/categoria-apaeb/163-agave-tequilanamexicanos-querem-produzir-na-regiao-do-sisal>>. Acesso em 10 Jan. 2016.

ARAÚJO, P. M.; NASS, L. L. CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE POPULAÇÕES DE MILHO CRIOULO. **Revista Scientia Agrícola**, v. 59, n. 3, p. 589-593, 2002.

ATLAS BRASIL. **Atlas do Desenvolvimento Humano no Brasil**. Consulta. 2013. Disponível em: <<http://www.atlasbrasil.org.br/2013/pt/consulta/>>. Acesso em: 09 Jan. 2016.

BARAKAT, M. N.; EL-SHAFEI, A. M.; AL-DOSS, A. Molecular mapping of QTLs for resistance to northern corn leaf blight in maize. **International journal of food, agriculture and environment**, v. 8, n. 2, p.547-552, 2010.

BATISTA, P. F.; LIMA, M. A. C.; LEÃO, P. C. S.; SOUZA, F. F. S.; ALVES, R. E. Divergência genética entre variedades de videiras do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 4, p. 800-808, 2015.

BERED, F.; NETO, J. F. B.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, v. 27, n. 3, p. 513-520, 1997.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Legislação Ambiental Básica**. Consultoria Jurídica. UNESCO, Brasília, p.17. 2008.

BUENO, L. C. S. **Melhoramento genético de plantas**. Princípios e procedimentos. Lavras: UFLA, 2006, 319 p.

CÂMARA DOS DEPUTADOS. **Legislação Informatizada - Decreto nº 31.329, de 22 de Agosto de 1952 - Publicação Original**. 1952. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1950-1959/decreto-31329-22-agosto-1952-339366-publicacaooriginal-1-pe.html>>. Acesso em: 03 de maio. 2016.

CARVALHO, L. P.; LANZA, M. A.; FALLIER, J.; SANTOS, J. W. Análise da diversidade genética entre acessos de banco ativo de germoplasma de algodão. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 10, p. 1149-1155, 2003.

CARVALHO, R. S.; PINTO, J. F. N.; REIS, E. F.; SANTOS, S. C.; DIAS, L. A. S. Variabilidade genética de cajuzinho-do-cerrado (*Anacardium humile* st. hill.) por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 1, p. 227-233, 2012.

CHAGAS, K. P. T.; SOUSA, R. F.; FAJARDO, C. G.; VIEIRA, F. A. Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineensis*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 1, p.147-152, 2015.

CHEN, J. M.; GITURU, W. R.; WANG, Y. H.; WANG, Q. F. The extent of clonality and genetic diversity in the rare *Caldesia grandis* (Alismataceae): comparative results for RAPD and ISSR markers. **Aquatic Botany**, v. 84, n. 4, p. 301-307, 2006.

CLIFFORD, H. T.; STEPHENSON, W. **An introduction to numerical taxonomy**. London: Academic Press, 1975. 229p.

COELHO, A. M.; BARBIN, D. SIMULAÇÃO DE DADOS VISANDO A ESTIMAÇÃO DE COMPONENTES DE VARIÂNCIA E COEFICIENTES DE HERDABILIDADE. **Revista de Matemática e Estatística**, v. 24, n. 2, p. 103-120. 2006.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Proposta de preços mínimos – safra 2013/2014**, Janeiro, 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_11_22_15_42_37_pm_imverno_13_14.pdf>. Acesso em: 05 maio. 2016.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Conjuntura especial. Sisal: Exportações em queda**. 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_07_28_17_46_03_sisal_conjuntura_jul_2016.pdf>. Acesso em: 18 fev. 2017.

COSTA, T. S.; SILVA, A. V. C.; LÉDO, A. S.; SANTOS, A. R. F.; JÚNIOR, J. F. S. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 5, p. 499-508, 2011.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, v. 2, 585p. 2003.

CRUZ, C. D. **Programa GENES**: Biometria: Versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2008.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. 1º ed. Viçosa: UFV, 620P. 2011.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 4º ed. Viçosa: UFV, 514p. 2012.

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

CUNHA, E. E.; LIMA, J. M. P.; LIRA, M. A. Estimativas de parâmetros genéticos para caracteres produtivos de sorgo forrageiro. **In: 46ª Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia**. Maringá-PR, p. 1-3, 2009.

DIAS, L. A. S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS A. C. **Eletroforese de Isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, p.405-475. 1998.

ENGELS, J. M. M. The use of botanical descriptors for cacao characterization: CATIE experiences. **In: International Workshop on Conservation**, Characterisation and Utilisation of Cocoa Genetic Resources in the 21st Century, Port-of-Spain (Trinidad and Tobago). p. 69-76. 1993.

FERRÃO, M. A. G.; VIEIRA, C.; CRUZ, C. D.; CARDOSO, A. A. Divergência genética em feijoeiro em condições de inverno tropical. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 37, n. 8, p. 1089-1098, 2002.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em**

análise genética. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220.p, 1998.

GARCÍA-HERRERA, E. J., MÉNDEZ-GALLEGOS, S. J., TALAVERA-MAGAÑA, D. El Genero *Agave* spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. **RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición**, Edición Especial, n. 5, p. 109-129, 2010.

GIL-VEGA, K.; CHAVIRA, G. M.; MARTÍNEZ DE LA VEGA, O.; SIMPSON, J.; VANDEMARK, G. **Analysis of genetic diversity in Agave tequilana var. Azul using RAPD markers.** *Euphytica*, 3^a. Ed. v.119, 2001, p.335- 341.

GRANICH, C. I., ALARCÓN, T. G., MÉNDEZ, G. R., MORENO, M. M., BAZÁN, J. G., SOTELO, A. O., RENDÓN, S. M.; NAVA, M. C. Conservación in situ y manejo campesino de magueyes mezcaleros. Grupo de Estudios Ambientales. México, 199 p. 2005. **Informe final SNIB-CONABIO.** Projeto No. V028.

GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V.; LANZA, M. A.; SCHUSTER, I. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, v. 30, n. 253, p.24-33. 2009.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Manual técnico de pedologia.** 2. ed. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão: Rio de Janeiro, 2007.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. LSPA - **Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil.** Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão: Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p. 1. 2015.

INFANTE, D.; MOLINA, D.; DEMEDEY, J. R.; GÁMEZ, E. Asexual Genetic Variability in Agavaceae Determined with Inverse Sequence-Tagged Repeats and Amplification Fragment Length Polymorphism Analysis. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 24, p. 205-217.2006.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. 3. ed. Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2007. 565 p.

LIMA, H. S. L.; NASCIMENTO, E.; BRÍGIDA, A. I. S.; ANDRADE, F. K.; ROSA, M. F.; BORGES, M. F. Aproveitamento do líquido do sisal como substrato para produção de celulose bacteriana. **In: XIX simpósio nacional de bioprocessos**. Foz do Iguaçu-PR. 2013.

LIMA, E. N.; ARAÚJO, P. M. E. B.; BERTINI, C. H. C. M.; MOURA, C. F. H.; HAWERROTH, M. C. Diversidade genética de clones de aceroleira avaliada por meio de marcadores moleculares ISSR. **Comunicata Scientiae**, v. 6, n. 2, p. 174-180, 2015.

LIU, B.; WENDEL, J. F. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, p.205-208, 2001.

LORENZONI, R. M.; SOARES, T. C. B.; SANTIAGO, V. F.; SILVA, J. A.; COELHO, R. I. UTILIZAÇÃO DE MARCADORES ISSR NA AVALIAÇÃO DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE BIRIBAZEIRO. **In: V Congresso Internacional & Encontro Brasileiro sobre Annonaceae: do gene à exportação**, v. 36, p. 251-257, 2014.

MARTIN, A. R.; MARTINS, M. A.; MATTOSO, L. H. C.; SILVA, O. R. R. F. Caracterização química e estrutural de fibra de sisal da variedade Agave sisalana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 1, p. 40-46, 2009.

MARTINS, E. C. A.; PELUZIO, J. M.; COIMBRA, R. R.; JUNIOR, W. P. O. Phenotypic variability and genetic diversity in sweet potato clones in the state of Tocantins. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 43, n. 4, p. 691-697, 2012.

MEDINA, J. C. **Plantas fibrosas da flora mundial**. Seção de plantas fibrosas. Instituto agrônômico de Campinas - SP. p. 289-290. 1959.

MENDONZA, A. J. G. Los agaves de México. **Ciências**, v. 87, p. 14-23, 2007.

MELO, W. M. C.; PINHO, R. G. V.; SANTOS, J. B.; FERREIRA, D. F. Utilização de caracteres morfoagronômicos e marcadores moleculares para a avaliação da divergência genética entre híbridos de milho. **Revista Ceres**, v. 48, n. 276, p. 195-207, 2001.

MISTRO, J. C.; FAZUOLI, L. C.; GALLO, P. B. OLIVEIRA, A. C. B.; TOMABRAGHINE, M.; SILVAROLLA, M. B. Estimates of genetic parameters in Arabic coffee derived from the Timor hybrid. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.7, p.141-147, 2007.

MOULIN, M. M.; RODRIGUES, R.; GONÇALVES, L. S. A.; SUDRÉ, C. P.; GONZAGA, M. P. A comparison of RAPD and ISSR markers reveals genetic diversity among sweet potato landraces (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). **Acta Scientiarum**, v. 34, n. 2, p. 139-147, 2012.

OLIVEIRA, F. L.; MOULIN, M. M.; BIANCHI, P. A.; PIMENTA, S.; RODRIGUES, R. Uso de marcadores ISSR para estimar a diversidade genética entre acessos de pimenta coletados no sul do estado do espírito santo. **Perspectiva online: ciências biológicas e da saúde**, v. 10, n. 4, p. 35-43, 2013.

RAMOS, J. P. C.; LUZ, L. N.; CAVALCANTI, J. J. V.; LIMA, L. M.; FREIRE, R. M. M. F.; FILHO, P. A. M.; SANTOS, R. C. Clustering fastigiata peanut accessions for selection of early-mature types suitable for the food market. **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 11, p. 1089-1094, 2015.

RESENDE, M. D. V. Correções nas expressões do progresso genético com seleção em função da amostragem finita dentro de famílias de populações e implicações no melhoramento florestal. **Boletim Pesquisa Florestal**, Colombo, n.22/23, p.61-77, 1991.

RESENDE, M. D. V. **Matemática e estatística na análise de experimentos e no melhoramento genético**. Colombo: Embrapa Florestas, 561 p. 2007.

RESENDE, M. A. V.; FREITAS, J. A.; LANZA, M. A.; RESENDE, M. D. V.; AZEVEDO, C. F. Divergência genética e índice de seleção via BLUP em acessos de algodoeiro para

características tecnológicas da fibra. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n.3, p. 334-340, 2014.

RODRIGUES, T. B.; SANTOS, J. B.; RAMALHO, M. A. P.; AMORIM, E. P.; SILVA, N. O. Identificação de QTLs em feijoeiro por meio de marcadores SSR influenciados pela seleção natural. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 5, p. 1351-1357, 2007.

RODRIGUES, J. F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. Mantiqueirae* (Flowie) Van der Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado) □ ESALQ/USP. Piracicaba.

ROJAS, G. A.; SOLANO, J. P. L.; PÉREZ, J. E. R. Diversidad genética en poblaciones de agaves pulqueros (*Agave* spp.) del nororiente del Estado de México. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 30, n. 1, p. 1-12. 2007.

ROTÍLI, E. A.; CANCELLIER, L. L.; DOTTO, M. A.; PELUZIO, J. M.; CARVALHO, E. V. Genetic divergence in populations of maize, in Tocantins State, Brazil. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 3, p. 516-521. 2012.

SANTANA, I. B. B.; OLIVEIRA, E. J.; SOARES FILHO, W. S.; RITZINGER, R.; AMORIM, E. P.; COSTA, M. A. P. C.; MOREIRA, R. F. C. Variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 868-876, 2011.

SANTOS, R. C. BRS 151 L7: nova cultivar de amendoim para as condições do Nordeste brasileiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 665-670, 2000.

SANTOS, E. BETTENCOURT, E. **Manual de apoio à formação e treino em Conservação ex situ de Recursos Fitogenéticos**. Instituto Nacional de Investigação Agrária (INIA), Lisboa, Portugal e Instituto Internacional para os Recursos Fitogenéticos (IPGRI-SSA), Nairobi, Quênia. p.207. 2001

SANTOS, J. W.; ALMEIDA, F. A. C.; BELTRÃO, N. E. M.; GHEYI, H. R. **Estatística experimental aplicada**. Campina Grande-PB. 213p. 2003.

SANTOS, D. A. J. Produção e consumo. In: ANDRADE, W. (org.). **O sisal no Brasil**. Salvador: Sindifibras; Brasília, DF. p. 45-55. 2006.

SANTOS, E. M.; PEDREIRA, E. M.; CARDOSO, C. E. L.; SOUZA, F. V. D.; SENA, M. G. C. Viabilidade econômica, em condições de risco, da produção de artesanatos, a partir de resíduos da planta de sisal (*Agave sisalana* Perrine), na região do Semi-Árido Baiano. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2. p. 1433-1436. 2007.

SANTOS, K. S. ESTUDO GENÉTICO E CITOGENÉTICO EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Agave* (AGAVACEAE). 2014. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana. Bahia.

SEBBENN, A. M.; SIQUEIRA, A. C. M. F.; KAGEYAMA, P. Y.; MACHADO, J. A. R. Parâmetros genéticos na conservação da cabreúva – *Myroxylon peruiferum* L.F. Allemão. **Scientia Forestalis**, n. 53, p. 31-38, 1998.

SILVA, O. R. R. F., BELTRÃO, N. E. M. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília: Embrapa -SPI; Embrapa Algodão. Campina Grande, PB, p.161. 1999.

SILVA, O. R. R. F.; COUTINHO, W. M.; CARTAXO, W. V., SOFIATTI, V., FILHO, J. L. S., CARVALHO, O. S., COSTA, L. B.: Cultivo do Sisal no Nordeste Brasileiro. **Circular Técnica 123**. Embrapa Algodão. Campina Grande, Paraíba, 2008.

SILVA, C. A. D. **Compósitos de polipropileno reforçados com fibras de sisal para uso na indústria automobilística**. 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo.

SILVA, O. R. R. F; CARTAXO, W. V; SILVA, J. C. A; ALVES, I. Sisal com tecnologia Embrapa para a geração de emprego e renda na agricultura familiar do Nordeste. **Folder**,

2011. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/57900/1/Folder-Cultivares-de-Sisal-da-Embrapa-Algodao.pdf>> Acesso em: 12 de Jan. 2017.

SILVA, J. F.; BERTINI, C. H. C. M.; BLEICHER, E.; MORAES, J. G. L. Divergência genética de genótipos de feijão-de-corda quanto à resistência ao pulgão-preto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 7, p. 948-954, 2012.

SPOONER, D.; VAN TREUREN, R.; VICENTE, M. C. Molecular markers for gene bank management. **IPGRI Technical Bulletin nº 10**, 2005. Disponível em: <http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx_news/Molecular_markers_for_genebank_management_1082.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2017.

SOUSA, L. G. Memórias de Economia. **A história do Agave Brasileiro**. 2004. Disponível em: <<http://www.eumed.net/cursecon/libreria/2004/lgs-mem/lgs-mem.htm>>. Acesso em: 15 out. 2016.

SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. R. F.; COUTINHO, W. M.; COSTA, L. B.; CARTAXO, W. V. **Cultivo de sisal na região semi-árida do Nordeste brasileiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 42p. 2006.

VALOIS, A. C. C.; NASS, L. L.; GÓES, M. Conservação ex situ de recursos genéticos vegetais. In: Nass, L. L.; Valois, A. C. C.; Melo, I. S.; Valadares-Inglis, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis, MT. Fundação MT. Cap 6, p. 123-149, 2001.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 496p. 1992.

WOEHL, O. Rotas Estratégicas/ biotecnologia agrícola e florestal. **A importância dos bancos ativos de germoplasma**. 2011. Disponível em: <<https://rotabiotecagricolaflorestal.wordpress.com/2011/07/14/a-importancia-dos-bancos-ativos-de-germoplasma/>>. Acesso em: 18 fev. 2017.