

ARTIGO

**AUTORES:****Caio Santos Silva¹****Maria Rosa Travassos
Costa²****Andréa Cristina****Rodrigues Fortes³****Larissa Coelho****Marques¹****Juliana Flor Aguiar³****José Ribamar Felipe****Marques²**¹ Universidade Federal do Pará –
UFPA, Av. Augusto Correa, 01,
66075-900, Belém, PA, Brasil² Embrapa Amazônia Oriental,
Travessa Enéas Pinheiro, s/n,
66095-100, Belém, PA, Brasil³ Universidade Federal Rural da
Amazônia – UFRA,
Av. Presidente Tancredo Neves,
2501, 66077-530,
Belém, PA, Brasil**Recebido:** 09/11/2011**Aceito:** 25/01/2012**Autor correspondente:**Caio Santos Silva
E-mail: scaio@hotmail.com**PALAVRAS-CHAVE:**

DNA

Polimorfismos

RAPD

Melhoramento genético

KEY-WORDS:

DNA

Polymorphism

genetic breeding

RAPD

Variabilidade genética em muçua utilizando marcadores moleculares RAPD

Genetic variability in *Kinosternon scorpioides* using RAPD molecular markers

RESUMO: O muçua (*Kinosternon scorpioides*) é uma espécie de extrema importância econômica no Estado do Pará, sendo indispensáveis estudos que viabilizem sua conservação e sua caracterização genética, a fim de direcionar programas de melhoramento nessa espécie e o monitoramento da sua variabilidade. O objetivo foi avaliar a variabilidade genética existente em populações de *Kinosternon scorpioides* do Banco de Germoplasma Animal da Amazônia Oriental (BAGAM), localizado em Salvaterra, na ilha de Marajó, no Estado do Pará, a fim de realizar uma caracterização molecular inicial da espécie. Foram utilizados marcadores moleculares RAPD (Polimorfismos de DNA Amplificados ao Acaso). Para tanto, foram obtidas amostras de DNA a partir de sangue total de 39 indivíduos de diferentes populações. A seleção de *primers* foi realizada a partir de um *screening* de quatro kits (kit OPA, OPU, OPJ, OPM), dos quais foram selecionados os doze mais polimórficos, que geraram bandas no intervalo de três a oito, viáveis para utilização. A análise de similaridade genética foi realizada com 53 marcadores RAPD, no programa NTSYS-pc, 2.0 utilizando o coeficiente de Jaccard. A partir dos dados gerados pela UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), pôde-se dimensionar a variabilidade existente entre os mesmos. Foram obtidos intervalos de similaridade genética variando de 3-98%, sendo que os indivíduos mais divergentes foram o M8 e o M14 com o M33 (0,03) e os mais similares, os genótipos M3 e o M4 (0,98). Os resultados indicaram a existência de variabilidade genética a ser explorada na espécie, tanto para programas de melhoramento genético como para a conservação da mesma.

ABSTRACT: *Kinosternon scorpioides* is a species of great economic importance in the State of Para; therefore, studies that enable its conservation and genetic characterization are essential, so that breeding programs can be directed to this species and its variability can be monitored. The objective of this study was to assess the genetic variability in populations of *Kinosternon scorpioides* Animal Germplasm Bank of the Eastern Amazon - BAGAM of the Embrapa Eastern Amazon, Salvaterra, Marajó island, Pará state of Brazil, in order to perform an initial molecular characterization of the species. Were used RAPD (DNA polymorphisms Random Amplified) molecular markers. To this end, were obtained DNA samples from whole blood of thirty-nine individuals from different populations. The selection of primers was performed after a screening of four kits (kit OPA, OPU, OPJ, OPM), of which twelve were selected that generated more polymorphic bands in the range of three to eight, and feasible for use in this study. The genetic similarity analysis was performed with 53 RAPD markers, on the NTSYS-pc program 2.0, using the Jaccard coefficient. From the data generated by UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), we could scale the variability between them. Were obtained genetic similarity intervals ranging from 3% to 98%, becoming the more divergent individuals M8 and M14 with the M33 (3%) and more similar genotypes M3 and M4 (98%). The results indicated the existence of genetic variability for being explored, in the species, as for breeding programs as the conservation.

1 Introdução

A degradação ambiental é a principal causa da diminuição da quantidade de indivíduos e da diversidade biológica (LOSKUTOFF, 1998). O crescimento da população humana interfere de modo devastador nos ecossistemas, uma vez que essa população explora, cada vez mais, o meio ambiente de forma não sustentável, prejudicando os *habitats* e as populações que neles vivem (WILDT et al., 1997; BALMFORD; BOND, 2005; GALVANI, 2007; PIMENTEL et al., 2007).

A conservação de recursos genéticos é uma alternativa para diminuir a perda contínua dos animais em razão da degradação ambiental (COSTA; MARTINS, 2008). Tal conservação é composta de ações estabelecidas para resgatar e manter disponível o potencial utilitário da biodiversidade ou da diversidade genética dos organismos (VILELA-MORALES; VALOIS; NASS, 1997). Dentro da classe de marcadores moleculares baseados na técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), o RAPD (Polimorfismos de DNA Amplificados ao Acaso) é ainda uma das opções mais baratas e rápidas para acessar a variabilidade no nível do DNA, e especialmente útil em análises intraespecíficas. Esses marcadores têm a vantagem de amplificar tanto regiões do genoma que podem ser transcritas e/ou traduzidas, como regiões não codificantes. Essa característica é importante quando o objetivo é avaliar a variação ao longo da maior parte do genoma da espécie (WILLIAMS et al., 1990; HILLIS et al., 1996; FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998). Esses marcadores apresentam também a vantagem de permitir trabalhar com qualquer espécie, uma vez que não há necessidade de conhecimento prévio de dados de sequência de DNA para a construção dos *primers* utilizados (FALEIRO, 2007).

Estudou-se o muçã (*Kinosternon scorpioides*), que é uma espécie semiaquática, com pés e mãos espalmados, e membrana interdigital reduzida. São tartarugas de pequeno porte, atingindo de 9,2 a 27 centímetros e pesando de 401 a 1000 gramas. A carapaça varia do marrom ao verde-oliva ou preto, a cabeça pode ser marrom cinza ou preta, com manchas de padrão creme, laranja, vermelho, rosa ou amarelo;

apresentam três quilhas no dorso (PRITCHARD; TREBBAU, 1984). Possui ampla distribuição na América do sul. No Brasil, esse quelônio habita permanentemente locais de campo alagado e não faz migração, havendo, portanto, reduzida concentração da espécie na Amazônia, com maior ocorrência na Ilha do Marajó. Ocorre também no Nordeste e Centro-Oeste do país (VANZOLINI et al., 1980).

Muito conhecido em Belém-PA, sua carne é apreciada em locais onde é típico e tradicional a servirem no próprio casco, sendo conhecida como “casquinha de muçã”. O prato não consta nos cardápios, pois os estabelecimentos que o oferecem estão correndo o risco de serem fechados. Por isso, é servido clandestinamente (DELDUQUE, 2000).

É apanhado aos milhares na ilha de Marajó e muito vendido no mercado de Belém; por essa prática, tem sofrido ameaças pela colheita/apanha desenfreada que vem ocorrendo ao longo dos anos. Nesse sentido, a Embrapa Amazônia Oriental iniciou no ano de 2004 as pesquisas com essa espécie e, visando à conservação da mesma, implantou uma coleção *in situ* no Banco de Germoplasma Animal da Amazônia Oriental (BAGAM), na ilha de Marajó, em Salvaterra, no Estado do Pará, Brasil.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética de populações de *Kinosternon scorpioides*, mantidos em conservação no BAGAM, utilizando-se marcadores moleculares.

2 Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular (LABGEN), da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém-PA. Foram utilizados 39 indivíduos de muçã pertencentes à coleção *in situ* do Banco de Germoplasma Animal da Amazônia Oriental (BAGAM), na ilha de Marajó, com as coordenadas geográficas 0° 42' 26.36" S e 48° 33' 30.64" O, em Salvaterra, no Estado do Pará-Brasil.

O DNA genômico total foi extraído a partir de sangue total, utilizando o protocolo desenvolvido por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989), modificado. As amostras foram coletadas em tubos a vácuo com capacidade de 5 mL contendo EDTA, para evitar coagulação, e conservadas a 4 °C até a extração. Foi

retirada uma alíquota de 150 μL de cada amostra e transferida para tubos de 15 mL identificados, aos quais foram adicionados 4 mL de tampão STE; 250 μL de CTAB 10% pH 7,2; 50 μL de ribonuclease (RNase A 10 mg mL^{-1}), e 50 μL de proteinase K 20 mg mL^{-1} . As amostras foram incubadas por uma hora a 55 °C em contínua agitação. Após esse período, foi adicionado 1 mL de NaCl 5M e os tubos foram agitados por 15 s. Em seguida, foram adicionados 3 mL de clorofórmio e as amostras foram agitadas por inversão, continuamente durante aproximadamente 3 min. Após essa etapa, foram levadas à centrifuga refrigerada a 5000 RPM durante 10 min, período após o qual houve a formação de sobrenadante, que foi transferido para tubos de 15 mL e adicionado volume igual de álcool isopropílico 95% gelado. Para que ocorresse a precipitação do DNA, os tubos foram invertidos gentilmente e, após isso, novamente levados à centrifuga, então por 5 min. Foi descartado o álcool e adicionados 500 μL de álcool etílico a 70% para remover sais. O álcool foi descartado e as amostras foram secas em estufa a 55 °C por uma hora. O DNA foi ressuscitado com 300 μL de tampão TE e armazenado em geladeira a 4 °C até a quantificação.

Os DNAs extraídos foram quantificados em gel de agarose a 1,0%, a partir da comparação de concentrações crescentes de DNA bacteriófago lambda (50, 100 e 200 ng μL^{-1}). Utilizaram-se 5 μL de DNA, adicionados com 3 μL de tampão de carregamento e 3 μL de água destilada autoclavada. A interpretação do gel foi baseada na intensidade das bandas dos DNAs comparadas com as intensidades das bandas do DNA lambda.

Após a quantificação, os DNAs foram diluídos a partir de uma alíquota da amostra total com tampão TE para a concentração de trabalho, 5 ng μL^{-1} . As amostras diluídas e concentradas foram armazenadas a -20 °C

Os *primers* utilizados eram compostos por dez nucleotídeos, oriundos da Operon Technologies (Alameda, CA, USA), contendo 60-70% de G+C. Para o uso corrente, os *primers* foram diluídos para a concentração de 1,3 μM .

A seleção de *primers* foi realizada mediante a utilização de seis genótipos de muçã. Inicialmente,

foi realizado um *screening* de *primers*, selecionando-se os que apresentaram melhor amplificação, buscando-se, dessa forma, um total de fragmentos polimórficos que fosse suficiente para discriminar os indivíduos. Foram avaliados quatro kits, cada um composto por 20 *primers* arbitrários, num total de 80 *primers*, sendo os kits: OPA, OPU, OPJ, OPM.

O protocolo baseou-se naquele desenvolvido por Williams et al. (1990) modificado. A amplificação ocorreu conforme uma PCR em condições normais, variando-se os *primers* de sequências arbitrárias, previamente selecionados.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 13 μL , contendo: água destilada autoclavada; PCR buffer (20 mM de Tris HCl (pH 8,0) e 50 mM de KCl); 2 mM de MgCl_2 ; 1 mM dNTP; BSA purificada (2,5 ng mL^{-1}); 1,3 μL de *primer* arbitrário; 1 U.I. de Taq polimerase, e 15 ng de DNA genômico.

As amplificações foram realizadas em um termociclador de DNA Amplitherm, modelo TX 96 plus. O programa utilizado na PCR consistiu de 40 ciclos, sendo cada um de 1 min a 94 °C, 1 min a 37 °C e 2 min a 72 °C, seguidos de mais 7 min a 72 °C, para a completa extensão dos produtos amplificados.

Para a separação dos produtos amplificados, foi utilizada a eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio para visualização do DNA sob luz ultravioleta. Após a amplificação a cada 13 μL de reação, foram adicionados 3 μL de azul de bromofenol para o monitoramento da corrida no gel. Foi utilizado TBE 1X (Trizma-base 0,1M; ácido bórico 1M, e EDTA 0,5M) como tampão do gel e da eletroforese.

Após a eletroforese, os géis eram visualizados e fotografados em equipamento de foto documentação por transiluminação em ultravioleta, para documentação e análise.

Para a avaliação dos resultados obtidos na reação de RAPD (Polimorfismos de DNA Amplificados ao Acaso), cada banda presente no gel foi designada como 1 (um) e a ausência de banda como 0 (zero). Com a obtenção desses dados, foi construída a matriz binária, que foi empregada para o cálculo das similaridades genéticas usando o Coeficiente de Jaccard por meio da Equação 1:

$$Sg_{ij} = \frac{a}{a+b+c} \quad (1)$$

em que: a = número de casos em que ocorre a presença da banda em ambos os indivíduos, simultaneamente; b = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo i; c = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo j.

As similaridades foram obtidas usando o pacote estatístico NTSYS-pc versão 2.02 e a construção do dendrograma foi realizada utilizando-se o método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas – UPGMA (Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Averages) (ROHLF, 2001).

O número ótimo de bandas foi analisado pelo método bootstrap (MANLY, 1997). Para cada par de acessos, a similaridade genética foi estimada por simulações com reamostragens de diferentes tamanhos (10, 20, 30, 40, 50 bandas) utilizando o software GQMOL (CRUZ; SCHUSTER, 2004). Nesta análise, foram obtidos: as estimativas de correlação de valores da matriz de similaridade, a soma de quadrados dos desvios em relação às reamostragens e o valor de estresse (E). O número de bandas polimórficas é considerado ideal quando o estresse assume valor menor que 0,05 (KRUSKAL, 1964). O teste de reamostragem do dendrograma (Bootstrap: 1000 replicações) foi baseado no programa WinBoot (YAP; NELSON 1996).

3 Resultados e Discussão

Dos 80 *primers* testados, 48 foram polimórficos, mostrando-se viáveis para o estudo pretendido; demonstrou-se também um aproveitamento de 60% na seleção de *primers*.

Para as reações de RAPD, foram selecionados 12 *primers* (Tabela 1), resultando um total de 65 marcadores variando de 200 a 2200 pb; destes, os que apresentaram bandas monomórficas foram excluídos, por serem comuns a todos os animais avaliados, não revelando assim diferenciação genética entre os mesmos.

Os padrões de bandas gerados pelas reações de RAPD foram nítidos e produziram, no geral, bandas de média a boa intensidade. As bandas

Tabela 1. *Primers* utilizados, com suas respectivas seqüências nucleotídicas e número de polimorfismos

| Primers | Seqüência dos nucleotídeos | Número de polimorfismos |
|---------|----------------------------|-------------------------|
| OPA-01 | 5'CAGGCCCTTC3' | 6 |
| OPA-09 | 5'GGGTAACGCC3' | 6 |
| OPA-11 | 5'CAATCGCCGT3' | 3 |
| OPJ-10 | 5'AAGCCCGAGG3' | 3 |
| OPJ-18 | 5'TGGTCGCAGA3' | 3 |
| OPM-08 | 5'TCTGTTCCCC3' | 8 |
| OPM-09 | 5'GTCTTGCGGA3' | 3 |
| OPM-10 | 5'TCTGGCGCAC3' | 4 |
| OPM-13 | 5'GGTGGTCAAG3' | 5 |
| OPU-02 | 5'CTGAGGTCTC3' | 5 |
| OPU-19 | 5'GTCAGTGCGG3' | 4 |
| OPU-20 | 5'ACAGCCCCCA3' | 3 |
| Total | | 53 |

de baixa qualidade ou as que geravam dúvidas na interpretação foram excluídas das análises.

Os *primers* utilizados amplificaram um total de 53 bandas polimórficas. O *primer* OPM 08 apresentou maior número de polimorfismos, totalizando oito bandas polimórficas. Os *primers* OPA-11, OPJ-18, OPM-09 e OPU-20 foram os que obtiveram menor número de polimorfismos, três bandas polimórficas.

Analisando-se 80 *primers* para serem utilizados na caracterização genética do quelônio (*Hydromedusa maximiliani*), Souza et al. (2002) selecionaram nove, os quais obtiveram padrões de bandas de boa resolução e confiáveis para serem utilizados no trabalho. Ao analisarem o índice de polimorfismo de 33 *primers* em genótipos (*Emydoidea blandingii*) uma tartaruga semiaquática, Mockford, Snyder e Herman (1999) obtiveram apenas 4,5% de variação.

Dentre os padrões polimórficos obtidos (Figura 1), estão representadas as bandas provenientes da amplificação com o iniciador de número OPM-13 para todas as amostras referentes aos espécimes de muçã, nas quais se podem observar regiões polimórficas, verificadas pela presença de bandas em algumas amostras, em detrimento de outras.

Com a finalidade de constatar se o número de fragmentos polimórficos amplificados foi capaz de representar a diversidade genética existente na espécie, foi realizada análise de reamostragem para determinar o número ótimo de marcadores.

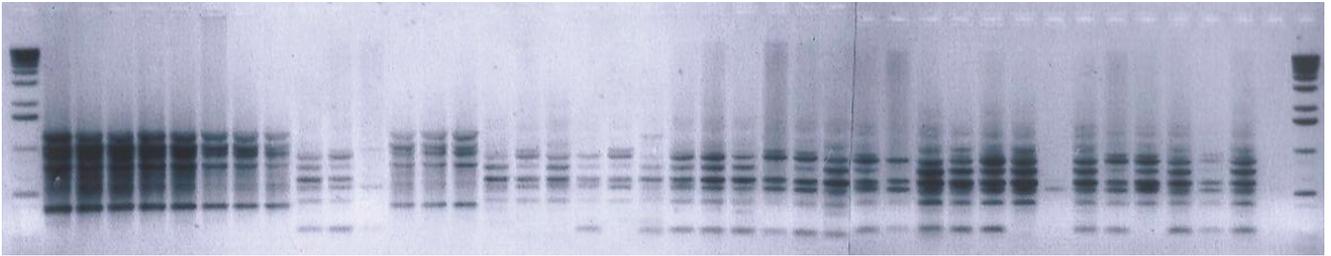


Figura 1. Amplificação com os 39 espécimes de muçuã com o iniciador de número OPM-13.

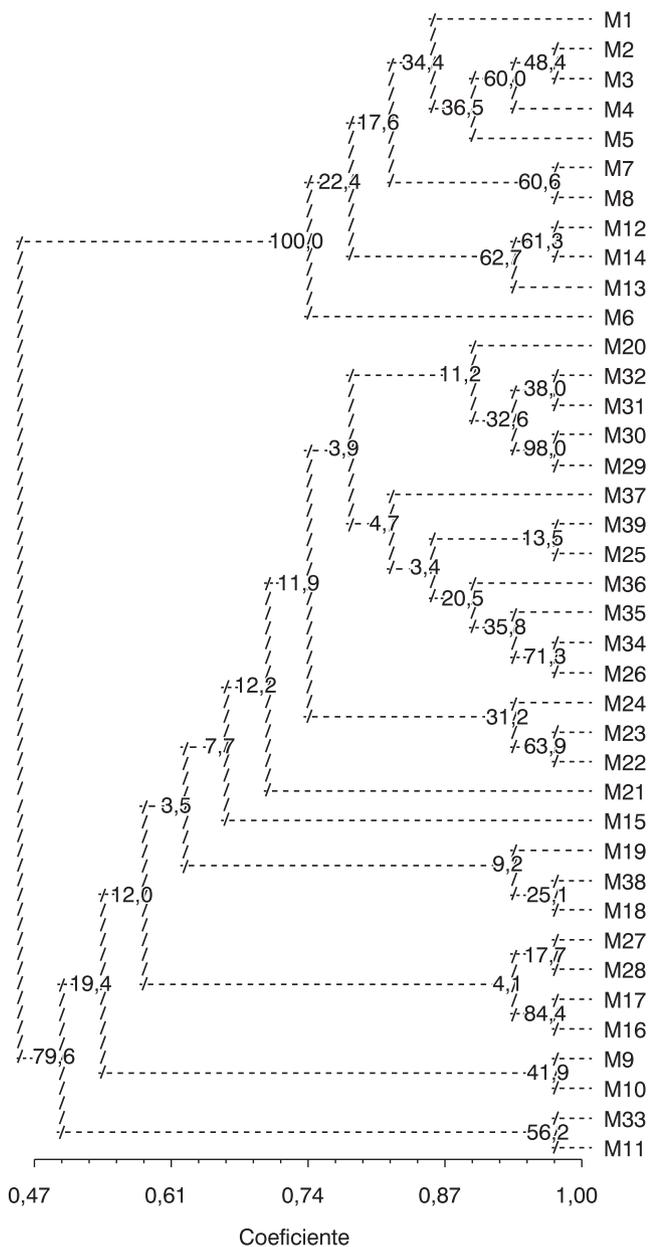


Figura 2. Dendrograma gerado pelo método de análise de cluster UPGMA para o coeficiente de Jaccard, para as 53 bandas polimórficas obtidas nos RAPDs.

Observou-se que houve uma relação direta entre o número de bandas analisadas e a magnitude de correlação dos valores da matriz de similaridade original, obtida a partir da reamostragem com diferentes números de bandas, com consistência a partir de 50 polimorfismos, quando a correlação atingiu 0,99 e valor de estresse de 0,04 (KRUSKAL, 1964). Neste trabalho, foram obtidos 53 fragmentos polimórficos, valor que se mostra adequado para a estimativa da variabilidade genética na espécie em questão. Segundo Dudley (1994), 53 marcadores polimórficos são suficientes para a análise de divergência genética, já que o autor considera que resultados no intervalo 50 a 100 marcadores tendem a coincidir com informações baseadas no *pedigree* das amostras.

A similaridade genética entre os genótipos foi estimada utilizando-se o coeficiente de Jaccard. Observou-se uma amplitude significativa nos valores de similaridade genética variando de 3-98%. A maior distância foi obtida comparando-se o M8 e M14 com o M33 (3%). O segundo maior distanciamento genético foi entre o M13 e o M10 (7%). Por outro lado, a maior similaridade genética foi entre o M4 e o M3 (98%) e a segunda maior similaridade foi entre os genótipos M3 com M2 (97%). Apesar de ser uma espécie bastante predada, nas amostras analisadas não se observa risco de erosão genética em função dos índices de variabilidade obtidos. Na Figura 2, encontra-se o dendrograma obtido pelo método UPGMA. Observa-se a formação de dois grupos principais, dentre estes, um grupo apresentando 11 indivíduos e um grupo maior com 28 indivíduos.

4 Conclusões

O padrão de variabilidade obtido sugere amplitude a ser explorada tanto na conservação quanto no melhoramento genético da espécie.

Nas amostras estudadas, não se observa risco de extinção da espécie por erosão genética.

Referências

BALMFORD, A.; BOND, W. Trends in the state of nature and their implications for human well-being. *Ecology Letters*, v. 8, p. 1218-1234, 2005. PMID:21352446. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00814.x>

COSTA, P. M.; MARTINS, C. F. Conservação de recursos genéticos animais através de biotécnicas de reprodução. *Universitas Ciências da Saúde*, v. 6, n. 1, p. 39-55, 2008.

CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. *GQMOL aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos*. versão 2.1. Viçosa: UFV, 2004.

DELDUQUE, M. *Ficha do bicho*. Rio de Janeiro: Globo Rural, 2000. v. 176, p. 83-84.

DUDLEY, J. W. Comparison of genetic distance estimators using molecular marker data. In: AMERICAN SOCIETY FOR HORTICULTURAL SCIENCE; CROP SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. *Analysis of Molecular Marker Data*. Corvallis: Oregon, 1994. p. 3-7.

FALEIRO, F. G. *Marcadores Genético-Moleculares aplicados a programa de conservação e uso de recursos genéticos*. Planaltina, 2007. 102 p.

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

GALVANI, A. The challenge of the food sufficiency through salt tolerant crops. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v. 6, p. 3-16, 2007. <http://dx.doi.org/10.1007/s11157-006-0010-3>

HILLIS, D. M., MORITZ, C. & MABLE, B. K. *Molecular Systematics*. 2 edition. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc., 1996.

KRUSKAL, J. B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a no metric hypothesis.

Psychometrika, v. 29, n. 1, p. 1-27, 1964. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02289565>

LOSKUTOFF, N. M. *Biology, Technology and Strategy of Genetic Resource Banking in Conservation Programs for Wildlife*. Gametes: Development and Function, 1998. p. 275-286.

MANLY, B. F. J. *Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in Biology*. London: Chapman & Hall, 1997.

MOCKFORD, S. W.; SNYDER, M.; HERMAN, T. B. A preliminary examination of genetic variation in a peripheral population of Blanding's turtle, *Emydoidea blandingii*. *Molecular Ecology*, v. 8, p. 323-327, 1999. PMID:10065547. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294X.1999.00525.x>

PIMENTEL, D. TORT, M.; D'ANNA, L.; KRAWIC, A.; BERGER, J.; ROSSMAN, J.; MUGO, F.; DOON, N.; SHRIBERG, M.; HOWARD, E.; LEE, S.; TALBOT, J. Ecology of Increasing Diseases: Population Growth and Environmental Degradation. *Human Ecology*, v. 35, p. 653-668, 2007. <http://dx.doi.org/10.1007/s10745-007-9128-3>

PRITCHARD, P. C. H.; TREBBAU, P. The Turtles of Venezuela. *Society for the Study of Amphibians and Reptiles*, 1984. 403 p.

ROHLF, F. J. *Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. New York, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.

SOUZA, F. L.; CUNHA, A. F.; OLIVEIRA, M. A.; PEREIRA, G. A. G.; REIS, S. F. Estimating dispersal and gene flow in the neotropical freshwater turtle *Hydromedusa maximiliani* (Chelidae) by combining ecological and genetic methods. *Genetics and Molecular Biology*, v. 25, n. 2, p. 756-762, 2002.

VANZOLINI, P.E., RAMOS-COSTA, A.M.M. & VITT, L.J. Répteis das Caatingas. *Academia Brasileira de Ciências*. Rio de Janeiro. 1980, 161 p.

VILELA-MORALES, E. A.; VALOIS, A. C. C.; NASS, L. L. *Recursos genéticos vegetales*. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa Cenargen, 1997. 78 p.

WILDT, D. E.; RALL, W. F.; CRITSER, J. K.; MONFORT, S. L.; SEAL, U. S. Genome Resource Banks. *BioScience*, v. 47, n. 10, p. 689-698, 1997. <http://dx.doi.org/10.2307/1313209>

WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v. 18, p. 6231-6235, 1990. PMID:1979162. PMCID:332606. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>

YAP, I.; NELSON, R. J. *Winboot*: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA based dendograms. Manila: International Rice Research Institute. 1996. 25 p. (Discussion Paper series, n. 14).