

**Universidade Federal do Piauí**

**Caracterização genética em germoplasma de cajuí (*Anacardium*  
spp.) por meio de marcadores morfoagronômicos e moleculares  
ISSR**

**Artemisa Nazaré Costa Borges**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal do Piauí como parte das exigências do  
Programa de Pós-graduação em Genética e  
Melhoramento para obtenção do título de  
“Mestre”.

**Teresina  
2015**

**Artemisa Nazaré Costa Borges**  
**Licenciada em Ciências Biológicas**

**Caracterização genética em germoplasma de cajuí (*Anacardium*  
*spp.*) por meio de marcadores morfoagronômicos e moleculares  
ISSR**

**Orientador:**

**Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima**

**Coorientadoras:**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Ângela Celis de Almeida Lopes**

**Dra. Maria Clideana Cabral Maia**

**Dissertação apresentada à Universidade  
Federal do Piauí como parte das exigências do  
Programa de Pós-graduação em Genética e  
Melhoramento para obtenção do título  
de “Mestre”.**

**Teresina  
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias  
Serviço de Processamento Técnico

**B732c** Borges, Artemisa Nazaré Costa

Caracterização genética em germoplasma de cajuí (*Anacardium* spp.) por meio de marcadores morfoagronômicos e moleculares ISSR / Artemisa Nazaré Costa Borges - 2016.  
102f.: il.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015  
Orientação: Prof.Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima

1 .*Anacardium* 2. Diversidade genética 3.Vegetação litorânea 4. Análise multivariada I.Título

**CDD 634.573**

**Caracterização genética em germoplasma de cajuí (*Anacardium spp.*) por meio marcadores morfoagronômicos e moleculares ISSR**

**Artemisa Nazaré Costa Borges**

**Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_**

**Comissão julgadora:**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aurinete Daienn Borges do Val - UESPI**

---

**Prof. Dr. Fábio Barros Britto – CCN/UFPI**

---

**Prof. Dr. Sérgio Emílio dos Santos Valente – CCN/UFPI /Suplente**

---

**Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima – Embrapa Meio-Norte**  
**(Orientador)**

*Aos meus pais Antônio e Evanilde, por  
tanto amor*

*Ofereço*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo seu imenso amor, por sempre estar cuidando de mim: “Eu, o Senhor, a vigio e a cada momento a regarei; para que ninguém lhe faça dano, de noite e de dia eu cuidarei dela.” Is 27:3;

À Universidade Federal do Piauí, por proporcionar minha formação desde a graduação;

À Embrapa Meio-Norte, pela oportunidade e por ter proporcionado que este trabalho pudesse ser realizado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

À Embrapa Agroindústria Tropical, por gentilmente ceder material vegetal;

Ao Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima, por quem tive o grande privilégio de ter sido orientada. Por sempre ter confiado muito em mim, pela paciência, ensinamentos, amizade. Pela sensibilidade em formar não apenas profissionais, mas, sobretudo seres humanos. Sempre serei muito grata;

À Dra. Ângela Celis de Almeida Lopes, por todo amor e tempo a mim dedicados, por ser tão presente, mesmo estando geograficamente tão distante;

À Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes, pelos ensinamentos, amizade e dedicação, por quem tenho imenso carinho, respeito e admiração. Por junto com a Prof. Ângela acolher a cada aluno do Programa de Genética e Melhoramento como filhos;

À Dra. Maria Clideana Cabral Maia pela grande contribuição na realização deste trabalho;

Ao Dr. Fabio Barros Britto, por muito ter contribuído na minha formação, pela orientação e ensinamentos no estágio em docência e colaboração na melhoria deste trabalho;

Ao Dr. Carlos Tadeu dos Santos Dias (USP/ESALQ) e ao Dr. Jaime Martínez Castillo (CICY-México), pelos ensinamentos e contribuição nas análises estatísticas;

Ao Dr. Lúcio, pelas sugestões que muito contribuíram para a melhoria deste trabalho;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em especial ao Dr. Sérgio Emílio dos Santos Valente e Dr. José Evandro Aguiar Beserra Júnior, pela atenção, conhecimentos e experiências transmitidas;

A toda a equipe da Embrapa Meio-Norte/UEP, em especial ao Pedro Pereira Neves, pelos ensinamentos, colaboração, enorme ajuda nas coletas de campo, sempre muito solícito;

Aos técnicos da Embrapa Meio-Norte, Leonardo Furtado de Oliveira pelos ensinamentos das técnicas de biologia molecular; e Diego Sávio Vasconcelos de Oliveira pelos ensinamentos e enorme colaboração nas análises químicas e coletas de campo;

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia da Embrapa Meio-Norte, em especial, Jéssica Bárbara, Yeda Gabriela e Kelly, pelo companheirismo, aprendizagens, apoio, amizade, por sempre estarem dispostas a colaborar;

Ao professor Dr. Adalberto Socorro da Silva, por ser meu maior exemplo de profissional, pelo incentivo e sempre estar torcendo pelo meu sucesso desde os tempos da graduação;

Aos meus pais Antônio e Evanilde, por tanto amor, dedicação e entrega. Por acreditarem e fazerem parte dos meus sonhos, por serem o melhor que existe em mim. Amo vocês;

Aos meus irmãos Nayane, Anderson e Natália, pelo companheirismo, paciência, carinho, vocês fazem parte de todas as minhas conquistas;

Ao meu melhor amigo e amor, Jesuino Martins, pela paciência, companheirismo, apoio, por ser sempre presente na minha vida. Seu amor me faz crescer;

A minha família e amigos pelo carinho, motivação, apoio e confiança, em especial a minha tia a quem carinhosamente chamo de mãe Mira, por todo o amor e pelas inúmeras vezes que anulou as suas vontades para viver as minhas;

Aos meus amigos de turma, Marcones, Mário, Bruna, Raimundo, Lívia e Anielle, pelo companheirismo, aprendizagens, por crescermos juntos e formarmos laços tão verdadeiros. Com vocês, tudo sempre parecia mais leve, mais fácil, possível, pois, “Se quer ir rápido, vá sozinho. Se quer ir longe, vá em grupo” (Provérbio africano);

Enfim, obrigada a todos que fizeram parte desta caminhada e que longe ou perto tornaram este sonho possível.

*“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria,  
aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da  
gente é coragem.”*

*João Guimarães Rosa*

## SUMÁRIO

	<b>RESUMO</b> .....	IX
	<b>ABSTRACT</b> .....	X
	<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	XI
	<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XIII
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
<b>2.1</b>	<b>Gênero <i>Anacardium</i></b> .....	17
<b>2.2</b>	<b>Algumas espécies de <i>Anacardium</i></b> .....	19
<b>2.3</b>	<b>Cajuí (<i>Anacardium</i> spp)</b> .....	19
2.3.1	Cajuí: características gerais e importância .....	20
<b>2.4</b>	<b>Análise Química</b> .....	22
<b>2.5</b>	<b>Análise da Diversidade de Recursos Genética aplicada a marcadores morfoagronômicos</b> .....	24
2.5.1	Análise de Componentes Principais (ACP) .....	24
2.5.2	Análises de Agrupamento .....	25
<b>2.6</b>	<b>Marcadores Moleculares</b> .....	27
2.6.1	Marcadores moleculares ISSR .....	27
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	30
<b>3</b>	<b>Diversidade genética em cajuí (<i>Anacardium</i> spp.) por meio de caracteres morfoagronômicos</b> .....	35
	RESUMO .....	35
	ABSTRACT .....	36
<b>3.1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	37
<b>3.2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	39
3.2.1	Material Vegetal .....	39
3.2.2	Coleta de dados .....	41
3.2.3	Análise dos dados .....	45
<b>3.3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	46
3.3.1	Caracterização dos acessos e relação entre as variáveis morfológicas .	46
3.3.2	Análise de Componentes Principais (ACP) .....	50
3.3.3	Análise da diversidade genética .....	53

3.3.4	Análises de agrupamento.....	54
<b>3.4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	59
<b>3.5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	64
	<b>REFERÊNCIAS</b>	65
<b>4</b>	<b>Diversidade genética em cajuí (<i>Anacardium spp.</i>) por meio de marcadores moleculares ISSR .....</b>	68
	RESUMO .....	68
	ABSTRACT .....	69
<b>4.1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	70
<b>4.2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	72
4.2.1	Material Vegetal .....	72
4.2.2	Extração do DNA.....	72
4.2.3	Quantificação e qualidade do DNA .....	75
4.2.4	Seleção de <i>primers</i> e reação em cadeia da polimerase (PCR).....	75
4.2.5	Resoluções e visualizações dos fragmentos amplificados .....	76
4.2.6	Análise dos dados.....	76
4.2.6.1	Análises preliminares e descritivas.....	77
4.2.6.2	Análise das relações genéticas.....	78
4.2.6.3	Análises de diversidade genética.....	78
4.2.6.4	Análise da estrutura e diferenciação genética .....	79
<b>4.3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	81
4.3.1	Diversidade genética .....	83
4.3.2	Análises das relações genéticas.....	83
4.3.3	Estrutura e diferenciação populacional.....	86
<b>4.4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	89
<b>4.5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	94
	<b>REFERÊNCIAS</b>	95
	<b>ANEXOS</b> .....	99

## RESUMO

BORGES, A. N. C. **Caracterização genética em germoplasma de cajuí (*Anacardium spp.*) por meio de marcadores morfoagronômicos e moleculares ISSR.** Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), UFPI, Teresina, 2015.

O cajuzeiro é uma planta característica da vegetação litorânea piauiense de grande importância socioeconômica e ambiental para a população local. A castanha é usada na alimentação ou comercializada em feiras e mercados locais. O pedúnculo possui elevado valor nutritivo, sendo empregado no preparo de doces, bebidas, sucos, tempero ou consumido *in natura*. A caracterização e avaliação das relações genéticas de acessos mantidos em bancos de germoplasmas é extremamente importante para a conservação da diversidade genética e sua utilização em programas de melhoramento genético. Este estudo teve por objetivo a caracterização molecular e morfoagronômica de acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Cajuí da Embrapa Meio-Norte, a avaliação da diversidade genética e a inter-relação entre os materiais. A caracterização morfoagronômica foi realizada por meio de variáveis morfológicas e químicas, sendo submetidas a análises multivariadas de componentes principais e de agrupamento. A caracterização molecular foi realizada usando nove *primers* ISSR, que amplificaram 104 locos, a partir dos quais foram estimados os índices de diversidade e estabelecidas as relações genéticas entre os acessos. O BAG do Cajuí da Embrapa Meio-Norte apresenta elevada diversidade genética, com potencial para o aproveitamento do pedúnculo na forma *in natura* e/ou para processamento dos seus derivados. Quanto à diversidade genética, os resultados demonstram que os acessos estão organizados em dois grupos distintos, o que pode ser explicado por diversos fatores, sendo os mais prováveis: o intenso fluxo gênico; a seleção realizada pelo homem; e a possibilidade de cruzamentos interespecíficos. Estas informações serão muito importantes para o melhor manejo do BAG do Cajuí e subsidiar futuros programas de melhoramento genético.

**Palavras-chave:** diversidade genética; vegetação litorânea; análise multivariada

## ABSTRACT

BORGES, A. N. C. **Genetic characterization of cashew germplasm (*Anacardium spp.*) using morpho-agronomic and ISSR molecular markers.** Dissertation (Master's Degree in Genetics and Breeding), UFPI, Teresina, 2015.

The cashew tree is a characteristic plant of the coastal vegetation of Piauí that has great socio-economic and environmental importance to local people. The cashew nut is used as a food source, or it is marketed in fairs and local markets. The cashew peduncle, which is the edible part, has high nutritional value and is used in the preparation of candies, drinks, juice, sauce or eaten raw. The characterization and evaluation of the genetic relationships of accesses maintained in germplasm banks are extremely important for the conservation of their genetic diversity and their use in breeding programs. This study aimed to perform a molecular and morpho-agronomic characterization of the cashews accesses from the cashew Active Germplasm Bank (AGB) at Embrapa Meio-Norte, and evaluate the diversity and genetic relationships among the cashew accesses. The morpho-agronomic characterization was performed through of morphological and chemical parameters, which were subjected to multivariate analysis of the principal components and clustering. The molecular characterization was performed using nine ISSR primers, which amplified 104 loci, from which were estimated the diversity rates and established the genetic relationships among the accesses. The cashew AGB located at Embrapa Meio-Norte presents high levels of genetic diversity, with potential for using cashew for fresh consumption and/or processing of its derivatives. The results of this study showed no association between the clusters formed and the collection sites. In addition, the results also demonstrated that the genetic diversity presented by the accesses is organized into two distinct genetic groups, which can be explained by several factors, including: the intense gene flow, the selection made by man, and the possibility of interspecific crosses. This information is very important for better management of the cashew AGB and support future breeding programs.

**Keywords:** genetic diversity; coastal vegetation; multivariate analysis

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Banco Ativo de Germoplasma de Cajuí pertencente à EMBRAPA Meio-Norte/UEP, Parnaíba- PI.....	39
Figura 2	- Caracteres analisados na caracterização morfoagronômica de cajuí. A – inflorescência. B – fruto (castanha). C – fruto e pseudofruto (pedúnculo). D – planta de cajuí.....	41
Figura 3	- Desenho esquemático da inflorescência de cajuí indicando as regiões de aferições baseadas nos descritores para caju referidos pelo IBPGR (1986) .....	43
Figura 4	- Desenhos esquemáticos de cajuí indicando as regiões de aferições baseadas nos descritores para caju referidos pelo IBPGR (1986). (A) referentes ao pedúnculo; (B) referentes à castanha.....	44
Figura 5	- Diversidade fenotípica de fruto e pseudofruto de acessos de <i>Anacardium</i> ssp., provenientes do BAG do Cajuí da Embrapa Meio Norte/UEP, Parnaíba-PI. ....	46
Figura 6	- Representação gráfica <i>biplot</i> da dispersão dos acessos analisados, entre os três primeiros componentes principais para as variáveis morfoagronômicas e químicas avaliadas em 18 acessos de <i>Anacardium</i> ssp., provenientes dos BAG do Cajuí da Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI.....	53
Figura 7	- Dendrograma resultante da análise multivariada de 18 acessos de <i>Anacardium</i> spp. com base em descritores morfológicos e químicos, pelo método de agrupamento UPGMA.....	57
Figura 8	- Perfil de amplificação do <i>primer</i> UBC 845 em gel de agarose a 1,5% de 17 genótipos de <i>Anacardium</i> . ....	82
Figura 9	- Perfil de amplificação de diferentes reações usando o mesmo <i>primers</i> UBC 808 e UBC 886.....	82
Figura 10	- Dendrograma (UPGMA) obtido a partir do coeficiente de similaridade de Dice-Sorensen de 32 acessos de <i>Anacardium</i> spp, provenientes dos municípios de Ilha Grande, Parnaíba e Luzilândia, estado do Piauí e município de Pacajús, estado do Ceará .....	85

- Figura 11 - Representação gráfica do  $\Delta K$  calculado de acordo com o proposto por Evanno et al. (2005). O maior valor de  $\Delta K$  corresponde ao K mais provável..... 87
- Figura 12 - Representação gráfica do teste de atribuição de acessos de cajuí provenientes da vegetação litorânea piauiense agrupados por regiões geográficas com valores de  $K = 2$  ..... 87
- Figura 13 - Representação esquemática do teste de agrupamento pelo software Structure usando a função USEPOPINFO; MIGRPRIOR = 0,05 e GENSBACK = 3..... 88

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Identificação da localização dos acessos de cajuí ( <i>Anacardium spp.</i> ) pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma do Cajuí da Embrapa Meio Norte, município de Teresina-PI e da UEP, município de Parnaíba - PI, usados na análise de diversidade genética baseada em marcadores morfoagronômicos e análises químicas .....	40
Tabela 2	- Matriz de correlações entre os dados morfométricos e variáveis químicas, avaliados de 18 acessos de <i>Anacardium ssp.</i> , provenientes do Banco Ativo de Germoplasma do Cajuí da Embrapa Meio Norte, município de Teresina-PI e da UEP, município de Parnaíba – PI, 2005 .....	49
Tabela 3	- Estimativa dos autovalores e porcentagem de variância associados aos três primeiros componentes principais, obtidos a partir da matriz de correlação entre variáveis morfométricas e químicas avaliados a partir de 18 acessos de <i>Anacardium ssp.</i> , pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma do Cajuí da Embrapa Meio Norte, município de Teresina-PI e da UEP, município de Parnaíba-PI.....	51
Tabela 4	- Contribuição relativa dos caracteres para divergência genética entre acessos de <i>Anacardium spp.</i> , com base nos descritores morfológicos e químicos, por meio do método de SINGH (1981).....	54
Tabela 5	- Agrupamento dos 18 acessos de <i>Anacardium ssp.</i> , procedentes pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma do Cajuí da Embrapa Meio Norte, município de Teresina-PI e da UEP, município de Parnaíba-PI, obtido a partir do método de otimização de Tocher por meio das variáveis morfoagronômicas e químicas avaliadas .....	56
Tabela 6	- Lista dos acessos de <i>Anacardium</i> pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma do Cajuí da Embrapa Meio Norte e ao Banco Ativo de Germoplasma do Caju pertencente a Embrapa Agroindústria Tropical, Pacajus-CE; usados na análise de	

diversidade genética baseada em marcadores moleculares

		ISSR	74
Tabela 7	- Características dos primers de marcadores ISSR avaliados na amplificação de DNA genômico de germoplasma de cajuí ( <i>Anacardium</i> spp)		76
Tabela 8	- Locos amplificados e quantidade de polimorfismo gerados por 9 primers de marcadores ISSR		81
Tabela 9	- Estimadores de diversidade genética de acessos de cajuí, usando 104 locos ISSR		83
Tabela 10	- Análise de Variância Molecular (AMOVA) obtida para duas populações de cajuí do litoral piauiense, usando 104 locos de marcadores ISSR		86

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Anacardium* foi descrito pela primeira vez por Lineu em 1735, segundo a taxonomia atual é constituído por cerca de 10 espécies. (MITCHELL; MORI, 1987). Entre as várias espécies e ecótipos existentes, as designadas como cajuí merecem atenção especial. Cajuí é uma terminologia usada para descrever espécies do gênero *Anacardium* que apresentam castanha e pedúnculo pequenos (CARBAJAL; SILVA JÚNIOR, 2003).

O cajuí é uma planta nativa que apresenta grande dispersão na região dos cerrados da Amazônia e das regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste brasileira (CRESPO; SOUZA, 2014). No estado do Piauí esta fruteira ocorre naturalmente na região dos cerrados e na região litorânea (RUFINO et al., 2007).

O cajuizeiro da vegetação litorânea piauiense possui grande importância econômica e social, sobretudo para as populações locais. O período de frutificação ocorre geralmente entre os meses de julho a dezembro, sendo mais concentrada nos meses de agosto e setembro, período este coincidente com a entressafra de culturas tradicionais (por exemplo, o arroz e o feijão), constituindo-se uma importante fonte alternativa de alimentação e renda para as populações que vivem ao seu entorno (RUFINO et al., 2008).

O pedúnculo tem um grande potencial nutricional, sendo observados em sua constituição teores consideráveis de açúcares, compostos fenólicos e minerais, destacando-se entre eles cálcio, ferro e fósforo, além da riqueza em vitamina C. O consumidor local aproveita os pedúnculos doces para consumo “*in natura*” e sucos, enquanto os pedúnculos ácidos para fabricação de doces (cajuí ameixa, em calda e massa) e, também, como tempero para carnes e peixes. A castanha também é usada como fonte alimentícia, sendo consumida na forma natural, ou usada como ingredientes em bolos, sorvetes, tortas, entre outros. Não obstante, a planta de cajuí apresenta grande importância ecológica, como fixadora de dunas (ALMEIDA, 2009; RUFINO et al., 2008; RUFINO, 2004; CRESPO; SOUZA, 2014).

Entretanto, mesmo em vista à grande potencialidade do cajuí, este ainda não é uma planta cultivada, e os produtos consumidos e/ou comercializados derivados do cajuizeiro são essencialmente provenientes do extrativismo realizado pelas comunidades locais, o que alerta para consideráveis riscos na

diminuição da diversidade genética desta planta nesta região. Deste modo, são necessários estudos que venham quantificar e avaliar a magnitude da variabilidade genética. Estimativas de diversidade genética podem ser obtidas pelo uso de marcadores genéticos fenotípicos, moleculares, ou pela combinação entre ambos, apresentando assim dados mais completos para as futuras ações de conservação e potencial utilização da variabilidade genética

Desta forma, este estudo teve por objetivo a caracterização molecular e morfoagronômica de acessos do Banco Ativo de Germoplasma do Cajuí da Embrapa Meio-Norte; e avaliar sua variabilidade e estruturação genética, visando, assim, gerar conhecimentos que poderão subsidiar futuros programas de melhoramento genético, bem como na preservação da diversidade genética desta fruteira nativa tão importante.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Gênero *Anacardium*

O gênero *Anacardium* (L.) pertence a família Anacardiaceae, a primeira descrição do gênero foi realizada por Lineu, que em 1753, referiu a espécie *Anacardium occidentale* como característica deste. O gênero apresenta distribuição natural ocorrendo na região neotropical (MITCHELL; MORI, 1987).

Existem várias hipóteses que tentam explicar e confirmar a origem de *A. occidentale*, entretanto, nenhuma delas foi totalmente comprovada. Diversas evidências indicam que a origem da espécie ocorreu mais provavelmente na região norte da América do Sul e parte da América Central, com maior destaque para o Brasil (BARROS; CRISÓSTOMO, 1995). Esta hipótese é reforçada pelos relatos de Alphonso de Candolle que registrou a ocorrência da planta em estado selvagem em grandes áreas de abrangência e diferentes habitat no Brasil, Guianas, Panamá e Antilhas (BARROS; PAIVA; CAVALCANTI, 1999).

Embora a origem americana do cajueiro ainda não seja totalmente comprovada, é certo que o Brasil é o mais importante centro de diversidade do gênero *Anacardium*, com o principal centro de diversidade na região amazônica, e centro secundário de diversidade na região do Planalto Central (MITCHELL; MORI, 1987). Além de ser o principal centro de diversidade do gênero, o Brasil, mais precisamente a região Nordeste brasileira, também é o principal centro de diversidade da espécie *A. occidentale*, que é a espécie de maior dispersão do gênero e única cultivada comercialmente (BARROS, 1991).

As características gerais do gênero foram inicialmente descritas por Mitchell e Mori (1987), as flores são reunidas em uma inflorescência do tipo panícula, rácimo composto com forma piramidal, com flores hermafroditas e estaminadas. A distribuição de flores por panículas apresenta uma proporção de 10% hermafroditas para 90% de flores masculinas, exibindo um sistema alterno de antese das flores, no qual as flores masculinas abrem-se por volta das 6 h e fecham-se às 10 h da manhã, já nas flores hermafroditas a antese ocorre no período entre as 10 h e as 12 h. Em relação à deiscência das anteras, nas flores masculinas ocorre por volta das 9 h e nas hermafroditas às 10 h. Os principais agentes polinizadores das flores de *Anacardium* são as abelhas das espécies *Apis mellifera* e a indígena *Centris tarsata* (FREITAS;

PAXTON, 1998; FREITAS; PAXTON; HOLANDA-NETO, 2002) sendo a primeira mais importante (PAULINO, 1992; SANTOS et al., 2007). Essas abelhas, diferente dos demais visitantes florais do cajueiro, possuem comportamento de forrageio apropriado à polinização, diferem as flores novas (brancas), que apresentam pólen viável e estigma receptivo, das velhas (vermelhas); tocam a antera e o estigma com a mesma parte do corpo (mesotórax); além de apresentarem constância floral (FREITAS; PAXTON, 1998; FREITAS; PAXTON; HOLANDA-NETO, 2002).

Após ser fertilizada, além do desenvolvimento do fruto, também ocorre a hipertrofia do pedicelo das flores bissexuais de *Anacardium*, resultando em um pedúnculo (hipocarpo) carnoso, comestível e bastante suculento. Por estar associada à castanha (fruto), estas características do pedúnculo desempenham importante papel na dispersão da semente, ao atrair um grande número de animais potenciais dispersores, sendo o principal deles os morcegos frugívoros, além do homem, que desempenha importante papel como agente dispersor (MITCHELL; MORI, 1987).

O período de floração ocorre na estação seca e a frutificação mais intensa no início da estação chuvosa. Na região Nordeste brasileira, o pico de frutificação dá-se entre os meses de agosto e dezembro, período este coincidente com a estação seca e, conseqüentemente, de menor ou nenhuma produção das lavouras. Portanto, apresenta-se como uma alternativa econômica bastante promissora para as comunidades rurais que implementam sua renda com os produtos provenientes da planta, principalmente a castanha de caju (GUANZIROLI et al., 2009).

Alguns fatores como a semelhança na morfologia floral, o compartilhamento dos mesmos agentes dispersores, os indicativos de poucas barreiras reprodutivas, associados à ocorrência natural de indivíduos com características intermediárias entre as diferentes espécies do gênero, possibilitam a ocorrência de híbridos interespecíficos, como sugerido para as três espécies simpátricas do Planalto do Brasil, a saber: *A. occidentale*, *A. humile* e *A. nanum*, (MITCHELL; MORI, 1987).

## 2.2 Algumas espécies de *Anacardium*

Segundo a revisão taxonômica mais recente realizada por Mitchell e Mori (1987) o gênero *Anacardium* é constituído por dez espécies. Dentre estas, a única espécie cultivada comercialmente é a *Anacardium occidentale* L., o caju, sendo também a de maior dispersão (MITCHELL; MORI, 1987; BARROS; CRISÓSTOMO, 1995). Existem dois tipos de cajueiro que se distinguem em relação ao porte, denominados de caju-comum e caju-anão-precoce (CAVALCANTI et al., 1999). O caju-anão-precoce é apontado como um ecótipo ou forma botânica do caju-comum e destaca-se por ser uma planta de baixo porte e iniciar o florescimento mais cedo, em comparação ao caju comum (BARROS, 1991; BARROS et al., 1993).

A espécie *Anacardium humile* A. St. Hill é endêmica dos cerrados do Brasil Central e adjacências do Paraguai Ocidental (MITCHELL; MORI, 1987). Seus pedúnculos caracterizam-se por apresentarem baixos valores de pH (3,28-3,77) (ALMEIDA, 2009), tornando o cajuzinho-do-cerrado um fruto de elevado potencial para aproveitamento pela indústria processadora e em futuros programas de melhoramento (CARVALHO et al., 2012). *A. giganteum* é uma árvore de grande porte presente nas regiões de floresta úmida e várzea tropical (MITCHELL; MORI, 1987).

Mitchell e Mori (1987) relatam a existência de uma espécie denominada *A. microcarpum* Ducke, bastante semelhante e sendo considerada como variabilidade de *A. occidentale*. Silva-Luz e Pirani (2014), também classificam *A. microcarpum* como um heterotípico de *A. occidentale*.

O aproveitamento comercial das demais espécies do gênero, em especial as classificadas como cajuí, ainda é restrita ao consumo local nas zonas produtoras. Como é o caso das espécies *Anacardium othonianum* Rizzini e *Anacardium humile* St. Hilaire, nativas da região Cento-Oeste brasileira, que apesar de serem pouco conhecidas e consumidas apresentam grande importância para a população regional (COSTA et al., 2010). O mesmo ocorre com o cajuí procedente da região litorânea piauiense.

## 2.3 Cajuí (*Anacardium* spp)

A terminologia caju tem origem no tupi “acaíu” (VIEIRA et al., 2006), da qual deriva a palavra cajuí (*caju+tupi í*, pequeno). De acordo com a

classificação da indústria processadora de castanha de caju, recebem a terminologia cajuí, as plantas que possuem peso do pedúnculo inferior a 3,33g (CARBAJAL; SILVA JÚNIOR, 2003). A classificação mais usada para designar plantas como cajuí é baseada na morfometria do fruto (castanha + pedúnculo), sendo consideradas cajuí aquelas plantas que possuem castanha e pedúnculo pequenos. A literatura reporta cajuís com peso médio das castanhas variando em uma amplitude de 0,63 g a 6,26 g (GOMES et al., 2009; CORRÊA et al., 2002 ), peso médio do pedúnculo variando de 15 a 20 g e comprimento de 3 cm (CRESPO; SOUZA, 2014), sendo considerados como cajuís pequenos aqueles que apresentam peso do pedúnculo inferior a 10 g (GOMES et al., 2013).

No entanto, é necessário evidenciar que estas duas classificações levam em consideração apenas dois caracteres morfológicos (castanha e pedúnculo), não sendo válida para determinação de espécies de *Anacardium*.

Lima (1988), ao realizar a descrição de espécies de *Anacardium*, classificam como cajuí (castanha + pedúnculo) as espécies: *A. amilcarianum*, *A. giganteum*, *A. humile*, *A. microcarpum*, *A. nanum* e *A. pumilum*.

### 2.3.1 Cajuí: características gerais e importância

A insuficiência de estudos de classificação botânica das plantas de cajuí presentes na vegetação piauiense inviabiliza a categorização destes em uma das espécies do gênero *Anacardium*. Tendo em vista que a classificação como cajuí é realizada tendo por base apenas o fruto (castanha + pedúnculo) e a existência de várias espécies de cajuí ocorrentes no território nacional, estes são designados apenas como *Anacardium* spp (CRESPO; SOUZA, 2014).

O porte das plantas de cajuí varia de 2 a 5 metros de comprimento, com a copa atingindo até mais de 15 metros de altura. Apresentam folhas mais duras que o caju comum, de coloração verde, sem pêlos e forma obovada. A inflorescência segue o mesmo padrão descrito para o gênero (CRESPO; SOUZA, 2014). O fruto verdadeiro, a castanha, abriga em seu interior uma amêndoa. O pedúnculo hipertrofiado e suculento possui coloração que varia do amarelo ao vermelho e forma que vai de ligeiramente achatada a arredondada possuindo grande variabilidade para caracteres químicos, como SST, ATT e razão SST/ATT (GOMES et al., 2009).

O tempo médio de emergência das sementes varia de 14,47 a 18,91 dias e índices de velocidade de emergência de 0,33 a 0,6, apresentando de 52,78% a 100% de germinação. Existe uma correlação significativa positiva entre as características da castanha e o tempo médio de emergência, ou seja, as castanhas maiores e mais pesadas são as mais vigorosas (CORREA et al., 2002).

O cajuí apresenta uma grande dispersão na região Nordeste brasileira, principalmente nos domínios do cerrado. No estado do Piauí, esta dispersão estende-se além dos cerrados, com populações naturais desta planta encontradas em áreas de transição, como nos tabuleiros costeiros (RUFINO et al., 2007) , constituindo-se característica da vegetação litorânea.

O litoral piauiense ocupa uma área territorial de 66 km abrangendo os municípios de Parnaíba, Ilha Grande, Luís Correia e Cajueiro da Praia (ANDRADE et al., 2012). Nesta região, a ocorrência do cajuí se dá nas áreas de restinga e carrasco, sendo mais concentrada nas comunidades Labino, Pedra do Sal, Cal e Tatus, onde desempenham grande importância ecológica, caracterizando-se como a vegetação pioneira de dunas (CRESPO; SOUZA, 2014). A importância ecológica do *Anacardium* é bastante difundida; na Nigéria, antes mesmo de serem conhecidos como uma importante cultura comercial, o cajueiro foi introduzido em áreas degradadas principalmente para arborização e controle da erosão (ALIYU; AWOPETU, 2007).

Esta frutífera nativa não apresenta somente importância ambiental, mas também desempenha um grande valor socioeconômico. Várias pesquisas apontam para a importância econômica e social do cajuí no litoral piauiense, especialmente para as populações que vivem nas regiões onde há maior abundância desta planta. Assim como o caju comum, a temporada de floração e frutificação do cajueiro ocorre entre os meses de junho a dezembro, sendo o período de maturação dos frutos mais concentrado nos meses entre agosto e novembro (SILVA et al., 1992; RUFINO, 2004). Este período é coincidente com a entressafra de culturas tradicionais (como, por exemplo, o arroz e o feijão), onde a disponibilidade de alimentos é escassa, deste modo o cajuí apresenta-se como uma importante fonte alternativa de renda e alimentação para a população local (RUFINO et al., 2008).

O aproveitamento do cajuí envolve tanto o fruto (castanha) como o pseudofruto (pedúnculo). A partir da castanha obtém-se a amêndoa que é muito apreciada, podendo ser consumida sozinha ou participando como ingrediente na composição de outros produtos, como por exemplo, na produção de sorvetes (RUFINO et al., 2008). O pedúnculo bastante nutritivo, com elevados teores de vitamina C (ALMEIDA, 2009), além de açúcares, compostos fenólicos e minerais, é consumido *in natura* ou na produção de doces (massa, ameixa, calda e cristalizado), temperos e bebidas (RUFINO, et al. 2008).

A conscientização da população local em relação à importância do cajuí é uma forma de colaboração aos programas de conservação e manejo adequado deste recurso genético vegetal. Segundo relatos de Rufino (2004), produtores locais conscientes da importância da espécie optam por preservar as plantas nativas de cajuí na área de suas propriedades. Essa relação de reconhecimento da importância e preservação do cajuí pela população local é muito importante, uma vez que, as populações das comunidades que vivem ao entorno são os principais agentes no extrativismo e comercialização do cajuí na região litorânea piauiense (RUFINO et al., 2008).

Nesta região observa-se além do cajuí, a ocorrência de plantas nativas de caju (*A. occidentale*). Constataram-se também semelhanças entre as duas, principalmente ao analisar a morfometria foliar, chegando por vezes a existir sobreposição em relação a este caractere para as duas plantas (VIEIRA; MAYO; ANDRADE, 2014), com registros de indivíduos que apresentam castanha e pedúnculo intermediários entre cajuí e caju, comumente denominado pela população local de cajuá (EMBRAPA MEIO-NORTE, 2002).

#### **2.4 Análises químicas em *Anacardium***

As análises químicas permitem inferir sobre a qualidade dos pedúnculos de *Anacardium* e seu potencial de aproveitamento para o consumo *in natura*, processamento de seus derivados ou duplo potencial.

A acidez é um dos fatores determinante para a qualidade dos frutos. O pH e a acidez total titulável (ATT) são indicativos da acidez. O pH é um dos principais indicativos na segurança alimentar, que por estar diretamente

associado a saúde do consumidor, torna a análise deste atributo químico bastante importante (CENCI, 2006).

O valor do pH está diretamente relacionado com a proliferação de microrganismos e à palatabilidade dos alimentos. De acordo com o valor do pH os alimentos podem ser classificados em três categorias: pouco ácidos (pH acima de 4,5); ácidos (pH entre 4,5 e 4,0) e muito ácidos (pH inferior a 4,0). Alimentos muito ácidos são os mais seguros do ponto de vista da segurança alimentar (HOFFMANN, 2001).

Padrões de referência para o processamento do pedúnculo de cajuí ainda não foram instituídos. No entanto, pela proximidade genética, os padrões para a espécie *A. occidentale*, caju comum, podem ser usados na determinação da qualidade de pedúnculos de cajuí. De acordo com as normas estabelecidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA para o processamento da polpa de caju, é delimitado valores para a ATT mínima de 0,30% e pH máximo de 4,6 (BRASIL, 2000).

Pedúnculos de cajuí são mais ácidos em comparação aos de caju comercial, apresentam elevado potencial para aproveitamento, principalmente considerando-se a segurança alimentar relacionada à proliferação de microrganismos (RUFINO, 2004).

Para o teor de SST medidos em °Brix, o MAPA estabeleceu como valor de referência para polpa de caju, valor mínimo de 10° Brix. O teor de SST é uma representação da concentração de açúcar apresentado pela solução analisada e a relação SST/ATT fornece o grau de doçura dos frutos, sendo um critério de avaliação do sabor. Frutos com altos valores destas variáveis apresentam elevados teores de doçura, sendo usados como controle da qualidade dos produtos (CHITARRA, 2001).

O valor SST é uma representação indireta do teor de açúcares nos frutos, podem chegar a 85-90% do teor dos sólidos solúveis, no entanto, não representa a sua totalidade (CHITARRA, 2001). Deste modo, a melhor indicação de sabor dos frutos é realizada por meio da razão SST/ATT do que pela análise isolada do teor de sólidos solúveis e acidez.

Elevados valores da relação SST/ATT são apreciados tanto para o consumo *in natura* quanto para o processamento pela indústria, uma vez que

altos teores de doçura mascaram o sabor adstringente encontrado em muitos frutos, como no caso do gênero *Anacardium*.

## 2.5 Análise da Diversidade de Recursos Genético aplicada a marcadores morfoagronômicos

Várias estatísticas têm sido empregadas para estabelecer distâncias genéticas baseadas em caracteres morfológicos. A caracterização e quantificação da diversidade genética entre indivíduos, amostras e populações podem ser realizadas por várias técnicas de análise multivariadas. Vicini (2005) descreve a estatística multivariada como aquela que contempla as variáveis de forma conjunta, onde múltiplas respostas são tomadas simultaneamente de um mesmo indivíduo. Entre os métodos estatísticos multivariados usados, destacam-se: análise de componentes principais (ACP); e métodos aglomerativos obtidos a partir de medidas de dissimilaridade: distância Euclidiana e a distância generalizada de Mahalanobis.

### 2.5.1 Análise de Componentes Principais (ACP)

A análise de componentes principais (ACP) é uma das ferramentas estatísticas multivariadas mais importante. Caracteriza-se por ser uma análise otimizadora, onde, a partir de  $p$  variáveis originais definidas por  $X_1, X_2, \dots, X_p$  são realizadas combinações lineares produzindo índices  $Z_1, Z_2, \dots, Z_p$ , não ortogonais entre si e representativos da variância contida nos dados originais. A não correlação dos índices  $Z$  assegura que cada componente principal possa contemplar diferentes dimensões dos dados. A ordenação dos índices se estabelece de tal forma a ser possível uma ordem decrescente na contribuição de cada índice na explicação da variância dos dados, de modo que  $\text{Var}(Z_1) \geq \text{Var}(Z_2) \geq \dots \geq \text{Var}(Z_p)$ , deste modo os índices  $Z$  são os próprios componentes principais (CPs) (MANLY, 2008).

Deste modo, a importância dos CPs é dada pela quantidade de variância total dos dados por estes retida, assumindo esta ordem de importância dos primeiros componentes principais, o CP1 é o mais importante na explicação da variância dos dados originais; o CP2 e o CP3, são o segundo e o terceiro, respectivamente nesta ordem de importância, portanto é esperado que a variância contida nos últimos componentes sejam tão baixa a ponto de ser

desprezível, podendo então ser descartada na análise dos dados. Proporcionando, quando bem sucedida, uma economia na análise dos dados (GONÇALVES; FRITSCHÉ-NETO, 2012; MANLY, 2008).

Existem alguns critérios para escolha do número de componentes principais a serem adotados, ou seja, aqueles que mais contribuíram para explicar a variabilidade existente nos dados, os mais usados são: I - Critério de Kaiser (1960) que indica a escolha dos autovalores maiores que 1; II - Critério de Johnson e Wichern (1992) indica que os autovetores devem explicar, no mínimo, 80% da variação acumulada.

Os CPs podem ser representados graficamente por meio de eixos cartesianos. Um método desenvolvido por Gabriel (1971), denominado de projeção *Biplot*, possibilita a representação gráfica de dados multivariados por meio de projeções em duas ou três dimensões. O prefixo “*bi*” indica que há uma sobreposição dos dados, sendo analisada de forma conjunta as  $p$  variáveis e  $n$  indivíduos.

Por meio da leitura dos dados é possível caracterizar e melhor discriminar os indivíduos analisados em relação às variáveis mensuradas, indicando qual a importância de cada variável na explicação da resposta apresentada pelos indivíduos. Sendo possível também, estabelecer a correlação entre as variáveis analisadas, através dos cossenos dos ângulos formados pelos vetores dessas variáveis (VAIRINHOS; GALINDO, 2004).

### 2.5.2 Análises de Agrupamento

Quando eficiente, a ACP possibilita a caracterização precisa dos indivíduos, e análises de agrupamentos podem ser realizadas para melhor classificação em categorias destes indivíduos. Análises de agrupamento são algoritmos que permitem a alocação dos indivíduos analisados em grupos, de modo que haja uma maior homogeneidade dentro dos grupos formados e heterogeneidade entre eles; esta classificação é realizada a partir de similaridades ou dissimilaridades entre os indivíduos (GONÇALVES; FRITSCHÉ-NETO, 2012). Existem diversas abordagens para a análise de agrupamento, Manly (2008) destaca duas: aquelas que produzem um dendrograma, denominadas de método hierárquico, a partir de cálculos das distâncias entre os indivíduos, sendo os grupos formados por métodos

aglomerativos ou dispersivos; e uma segunda, que envolve a possibilidade de partição, em que os indivíduos movem-se para fora ou para dentro dos grupos nos diferentes estágios da análise.

O método de ligação média entre grupos, ou UPGMA (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*) é um método de agrupamento hierárquico bastante usado. Consiste na construção de um dendrograma a partir do indivíduo de maior similaridade. Outro método de agrupamento bastante empregado é o de otimização de *Tocher*, onde grupos são formados tendo por base uma matriz de similaridade, o par que apresentar a menor distância irá compor o primeiro grupo, onde novos indivíduos poderão ser incorporados, o que será direcionada pelo valor das distâncias inter e intragrupos (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011; GONÇALVES; FRITSCHENETO, 2012).

Os primeiros estudos com o objetivo de verificar a diversidade genética existente no gênero *Anacardium* foram realizados por Barros (1991) ao avaliar acessos procedentes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Cajueiro da EMBRAPA Agroindústria Tropical, por meio de técnicas multivariadas de componentes principais e método de otimização de *Tocher*. Os resultados obtidos apontam as estatísticas multivariadas empregadas como eficientes no estudo da diversidade genética por meio de caracteres morfológicos. Além de sustentar a hipótese do Nordeste brasileiro como centro de diversidade de *A. occidentale* e o caju anão precoce como um tipo ou ecótipo de *A. occidentale*.

Pessoni (2007) avaliou a diversidade genética em *Anacardium* spp., de acessos pertencentes ao BAG do Cajueiro da EMBRAPA Agroindústria Tropical e uma população natural de *Anacardium occidentale* L., a partir de descritores morfométricos do caju desenvolvidos pelo IBPGR (International Plant Genetic Resources Institute) através das funções discriminantes de Anderson; componentes principais e análise de agrupamento pelos métodos de UPGMA e de otimização de *Tocher*.

Análises de variáveis morfológicas também foram realizadas com *Anacardium* spp. provenientes do litoral piauiense, merecendo destaque os trabalhos de Rufino (2004); Maia et al. (2012); Vieira, Mayo e Andrade (2014).

## 2.6 Marcadores Moleculares

Marcadores genéticos fornecem dados informativos que permitem inferir algum tipo de resposta às características analisadas, por meio de dados morfológicos, bioquímicos ou moleculares.

Algumas técnicas moleculares vieram auxiliar os ganhos obtidos no melhoramento, dentre estas tecnologias está o estudo do polimorfismo do DNA (BORÉM; FRITSCHÉ-NETO, 2013). Polimorfismo são as variações no tamanho dos fragmentos de DNA que quando comparados podem fazer a distinção entre indivíduos diferentes sendo acessados por meio de marcadores moleculares (BORÉM; SANTOS, 2004).

De acordo com os métodos de análise, os marcadores moleculares podem ser classificados em três grupos: I – Marcadores Baseados em PCR; II – Marcadores Baseados em Sequenciamento e III- Marcadores Baseados em Hibridização (BORÉM; FRITSCHÉ-NETO, 2013).

Os marcadores moleculares mais comuns que empregam a técnica de PCR são: SSR (*simple sequence repeats* ou microssatélites); ISSR (*inter simple sequence repeats*); AFLP (*amplified fragment length polymorphism*); RAPD (*random amplified polymorphic*) e SCAR (*sequence characterized amplified regions*).

Os microssatélites são sequências de DNA presentes e bem distribuídas nos genomas eucariotos, apresentando de um a seis pares de base que se repetem em tandem presentes nos DNAs nuclear, cloroplastidial e mitocondrial. As sequências microssatélites irão diferir em tamanho e unidades de repetição (TURCHETTO-ZOLET et al., 2013).

### 2.6.1 Marcadores moleculares ISSR

A técnica de ISSR foi inicialmente descrita de modo independente, mas seguindo o mesmo princípio, por Gupta et al. (1994); Zietkiewicz, Rafalski e Labuda (1994) e Wu et al. (1994), e consiste na amplificação de sequências idênticas de DNA localizadas entre dois microssatélites. Diferente dos microssatélites, que requerem dois *primers*, os ISSRs necessitam apenas de um *primer*, sendo este o próprio microssatélite, em geral com 16 a 25 pb comprimento (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002). Os *primers* são desenvolvidos considerando-se apenas os motivos repetidos ou em combinação com

ancoragem de uma a quatro bases degeneradas nas extremidades (3' ou 5') dos primers (ZIETKIEWICZ; RAFALSIK; LABUDA., 1994; GUPTA et al., 1994). Em cada reação de PCR são geradas várias bandas, onde cada uma delas é correspondente a uma sequência de DNA delimitada por dois microsatélites idênticos orientados em sentido invertido (BORNET; BRANCHARD, 2001) permitindo à amplificação simultaneamente de diferentes regiões do genoma.

Marcadores ISSR mostram-se eficientes nos estudos de genomas completos, sendo amplamente usados nos estudos de diversidade, estudos filogenéticos, mapeamento e seleção assistida (GUPTA et al., 1994; BORNET; BRANCHARD, 2001; REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002).

Entre as vantagens apresentadas por este marcador, as mais relevantes são: técnica simples e rápida; ampla cobertura do genoma e a possibilidade de análise simultânea de um grande número de locos por ensaio (BORNET; BRANCHARD, 2001).

O uso de marcadores ISSR tem possibilitado a identificação, caracterização de germoplasma e a avaliação da diversidade genética a nível inter e intrapopulacional de diversas espécies em especial quando se trabalha com aquelas cuja informação do genoma ainda não está disponível.

Trabalhos iniciais envolvendo o uso de marcadores moleculares em *Anacardium* foram desenvolvidos por Silva-Neto et al. (1995), usando marcadores RAPD na identificação de clones de cajueiro anão precoce. Archak et al. (2003), procederam a caracterização *fingerprinting* por meio de marcadores RAPD e ISSR de 24 seleções e 11 híbridos de *A. occidentale* mantidas pelo National Research Centre for Cashew, Puttur, Karnataka, gerando um total de 94 locos que foram capazes de discriminar as variedades de modo eficiente.

A partir de então, outros estudos foram desenvolvidos empregando marcadores moleculares na análise de diversidade e relações intra e interpopulacionais de *Anacardium*. Destaque pode ser dado ao estudo desenvolvido por Personi (2007) ao avaliar a diversidade genética de *Anacardium* ssp. de acessos pertencentes ao BAG do Cajueiro da EMBRAPA Agroindústria Tropical e uma população natural de *Anacardium occidentale* L., dentre estes acessos dois são pertencentes ao estado do Piauí. Thimmappaiah et al. (2009) avaliaram a diversidade genética de germoplasma de caju por

meio de marcadores moleculares RAPD e ISSR, descrevendo serem os marcadores ISSR mais eficientes na detecção de polimorfismo e determinação da diversidade genética em *Anacardium*, sendo observada certa correspondência entre dados morfológicos e moleculares, no entanto não houve relação entre os agrupamentos formados e a origem geográfica.

## REFERÊNCIAS

- ALIYU, O. M.; AWOPETU, J. A. Multivariate Analysis of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Germplasm in Nigeria. **Silvae Genetica.**, v.56, p.3–4, 2007.
- ALMEIDA, A.S. **Qualidade, compostos bioativos e atividade antioxidante total de pendúculos de cajuzeiros e frutos de umbuzeiros nativos do semi – árido do Piauí.** 2009. 186f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Semi – Árido, Mossoró, 2009.
- ANDRADE, I. M. de, et al. Diversidade de Fanerógamas do Delta do Parnaíba – Litoral Piauiense. In: GUZZI, A. **Biodiversidade do Delta do Parnaíba: litoral piauiense.** Parnaíba: EDUFP, 2012.
- ARCHAK, S.; GAIWARD, A.B.; GUATAM, D.; RAO, E.V.V.B.; SWAMY, K.R.M.; KARIHALOO, J.L. DNA fingerprinting of Indian cashew (*Anacardium occidentale* L.) varieties using RAPD e ISSR techniques. **Euphytica.**, v. 230, p. 397-404, 2003.
- BARROS, L.M.; PIMENTEL, C.R.M.; CORREA, M.P.F.; MESQUITA, A.L.M. Embrapa – CPAT **Recomendações técnicas para a cultura do cajueiro-anão-precoce.** Fortaleza, 1993, 65p.
- BARROS, L. M. **Caracterização morfológica e isoenzimática do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) tipos comum e anão-precoce, por meio de técnicas multivariadas.** 1991. 256f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ, Piracicaba, 1991.
- BARROS, L. M.; CRISÓSTOMO, J. R.. Melhoramento genético do cajueiro. In: ARÁUJO, J. P. P. de; SILVA, V. V. Embrapa: Brasília. **Cajucultura, modernas técnicas de produção**, 1995, p. 73-96.
- BARROS, L. M; PAIVA, J.R.; CAVALCANTI, J.J.V. Recursos genéticos de cajueiro: situação atual e estratégias para o futuro. In: QUEIROZ M.A.; GOEDERT C.O.; RAMOS S.R.R. Embrapa: Petrolina. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**, 1999, p. 1–22.
- BORÉM, A.; SANTOS, F. R. S. **Biotecnologia simplificada.** 2.ed. Viçosa:Suprema,2004.
- BOREM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas.** 1. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter.**, v.19, p. 209–215, 2001.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 01, de 07 de janeiro de 2000. Anexo I. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan. 2000. Seção 1. p.54

CARBAJAL, A. C. R.; SILVA JÚNIOR, N. Sebrae-CE/Embrapa, Fortaleza. **Castanha de caju: recomendações práticas para a melhoria da qualidade.** Agroindústria Tropical, 2003,16p.

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

CAVALCANTI, J. J. V.; PAIVA, J. R. de ; BARROS, L.M.; CRISÓSTOMO, J. R. Banco ativo de germoplasma de caju: variabilidade, caracterização e utilização. In: FERREIRA, F. R. Embrapa/CNPAT. **Recursos genéticos de espécies frutíferas no Brasil**, Brasília, 1999.

CENCI, S. A. Boas Práticas de Pós-colheita de Frutas e Hortaliças na Agricultura Familiar. In: FENELON, N. N. (Org.).Embrapa Informação Tecnológica. **Recomendações Básicas para a Aplicação das Boas Práticas Agropecuárias e de Fabricação na Agricultura Fam**

CHITARRA, A. B.. **Tecnologia de Pós-Colheita para Frutas Tropicais.** 1. ed. Fortaleza: Instituto De Desenvolvimento da Fruticultura e Agroindústria-SINDIFRUTA, v. 150, 2001, 314p .

CORRÊA, M. P. F.; RUFINO, M. S. M.; VASCONCELOS, L. F. L.; RIBEIRO, V. Q.; SOARES, E. B.; ARAÚJO, E. C. E. Germinação e vigor de sementes de genótipos de cajuí (*Anacardium* spp.). In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 17, 2002, Belém. **Os novos desafios da fruticultura brasileira: anais.** Belém: SBF, 2002.

COSTA, T. A.; FARIA, J.; NAVES, R. ; VIEIRA, R. F. Cajus do Cerrado. In: Vieira; R.F.; Agostini-Costa,T.S.; Silva,D.B.;Sano, S.M.;Ferreira,F.R. Embrapa: Brasília. **Frutas Nativas da região centro-oeste**, 2010, p. 143-162.

CRESPO, M.F. V.; SOUZA, L. I de. **Cajuí: boas práticas e manejo sustentável.** Parnaíba: Sieart, 2014.

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

EMBRAPA MEIO-NORTE. Cajuí: Potencial para a agroindústria familiar. Teresina, ano 4, n.12, Out./Nov./Dez., 2002. Encarte técnico, p. 5.

FREITAS, B.M.; PAXTON, R.J. A comparison of two pollinators: the introduced honey bee *Apis mellifera* and an indigenous bee *Centris tarsata* on cashew *Anacardium occidentale* in its native range of NE Brazil. **Journal of Applied Ecology.**, v.35, p.109-121, 1998.

FREITAS, B. M.; PAXTON, R. J.; HOLANDA-NETO, J. P. Identifying

Pollinators Among an Array of Flower Visitors, and the Case of Inadequate Cashew Pollination in NE Brazil. In: KEVAN P.; IMPERATRIZ-FONSECA V. L. (Eds.). **Pollinating Bees-The Conservation Link Between Agriculture and Nature**. Brasília: Ministry of Environment. p.229-244, 2002.

GABRIEL, K. R. The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. **Biometrika**,v.58, p.453-467, 1971.

GOMES, S. O. et al. Características físicas e químicas de frutos de cajuí (*Anacardium* spp.). In: **Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. Gurapari, 2009.

GOMES, S. O.; SOUZA, V. A. B. S. de; COSTA, M. do P. S. D.; SILVA, C. C. P. da; VALE, E. de M.; SOUSA, M. de; SOUSA, J. P. de B. Avaliação da qualidade física e química de cajuí (*Anacardium* spp.) na região Meio-Norte. **Geintec**,v.3, p.139-145, 2013.

GONÇALVES, M. C.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Tópicos Especiais de Biometria no Melhoramento de Plantas**. Viçosa: Suprema, 2012.

GUANZIROLI, C. E.; BASCO, C.; SABOYA, A.; SOUZA FILHO, H. M. Entraves ao Desenvolvimento da Cajucultura no Nordeste: margens de comercialização ou aumentos de economias de escala?. **Extensão Rural**, v. 16, p. 96-122, 2009.

GUPTA, M. et al. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theor Appl Genet.**, v.89, p.998–1006, 1994.

HOFFMANN, F. L. Higiene: Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. **Brasil Alimentos**, São Paulo, Signus Editora Ltda, n. 9 ,v.1 – Jul./Ago. 2001.p. 23-30.

KAISER, H. F. The application of electronic computers to factor analysis. **Educational and Psychological Measurement**., v. 20, p. 141-151, 1960.

LIMA, V. P. M. S. **A Cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: ETENE,1988, p.448.

MAIA, M.C.C ; OLIVEIRA, L. C. ; ALMEIDA, A. S. ; ARAUJO, L. B. ; VASCONCELOS, L. F. L. ; LACERDA, M. N. . Divergência genética e correlações entre variáveis agro-industriais da população de trabalho de cajuí da EMBRAPA Meio-Norte. In: II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2012, Belém.

MANLY, B. F. J. **Métodos estatísticos multivariados: uma introdução** Tradução Sara Ianda Carmona. 3.ed. Porto Alegre: Bookmam,2008,p. 229.

MITCHELL, J.O.; MORI, S.A. The cashew and its relatives (*Anacardium occidentale* L.). **Memoirs of the New York Botanical Garden.**, v. 42, n.1, p. 1-76, 1987.

PAULINO, F.D.G. **Polinização entomórfila em cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) no litoral de Pacajus – CE.** 1992. 70f. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.

PESSONI, L. A. **Estratégias de Análise da Diversidade em Germoplasma de Cajueiro (*Anacardium* spp. L.).** 2007. 159 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

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

RUFINO, M.S.M. **Qualidade e potencial de utilização de cajuís (*Anacardium* spp.) oriundos da vegetação litorânea do Piauí.** 2004. 92 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2004

RUFINO, M. S. M.; CORRÊA, M. P. F.; ALVES, R. E.; BARROS, L .M.; LEITE, L. A. S. Embrapa Agroindústria Tropical. **Suporte tecnológico para a exploração racional do cajueiro.** Fortaleza, 2007, p.30.

RUFINO, M.S.M.; CORRÊA, M.P.F.; ALVES, R.E.; LEITE, L.A.S. Utilização atual do cajuí nativo da vegetação litorânea do Piauí, Brasil. **Proceedings of the Tropical Region - American Society for Horticultural Science**, v.52, p.147-149, 2008.

SANTOS, S.K.D.; GOMES, L.P.; SOUZA, L.E.C; WALDSCHMIDT, A.M. **Visitantes florais do caju anão precoce (*Anacardium occidentale* L.) em uma área de caatinga no município de Jequié – BA.** In: Congresso de Ecologia do Brasil. Caxumbu, 2007.

SILVA, J. A. da; SILVA, D. B. da; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M de. Embrapa: Planaltina. **Coleta de sementes, produção de mudas e plantio de espécies frutíferas nativas dos cerrados: informações exploratórias.** Planaltina, 1992.

SILVA-LUZ, C.L; PIRANI, J.R. Anacardiaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB44>>. Acessado em 09 de Abril de 2015.

SILVA-NETO, S. P.; MARUTA, I.; TAKAIWA, F.; OONO, K.; MATSUMOTO, K. Identification of cashew (*Anacardium occidentale* L.) seedlings with RAPD markers. In: International Symposium on Tropical Fruits. **Acta Horticulture.**, v.370, p.21-26, 1995.

VIEIRA, M.; MAYO, S. J.; ANDRADE, I. M. Geometric morphometrics of leaves of *Anacardium microcarpum* Ducke and *A. occidentale* L. (Anacardiaceae) from the coastal region of Piauí, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica.**, [s.v.;s.p.], 2014.

VIEIRA, R.F.V.et al.Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Frutas Nativas da Região Centro – Oeste do Brasil.** Brasília: 2006, 320p.

VICINE, Lorena. **Análise multivariada da teoria à prática.** Santa Maria: CCNE, 2005, 215p.

THIMMAPPAIAH; SANTHOSH, W.G.; SHOBHA, D.; MELWYN, G.S. Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR Markers. **Scientia Horticulturae.**, v.120, p.411–417, 2009.

TURCHETTO-ZOLET, A. C. ; SEGATTO, ANA ; TURCHETTO, C. ; PALMA-SILVA, C. ; FREITAS, LORETA . **Guia prático para estudos filogeográficos.** 1. ed. Ribeirão Preto: SBG, 2013.

VAIRINHOS, V. M.; GALINDO, M. P. (XI Jornadas de Classificação e Análise de Dados, Lisboa). **Biplots PMD - Data Mining Centrada em Biplots. Apresentação de um Protótipo,** 2004.

WU, K.; JONES, R.; DANNAEBERGER, L.; SCOLNIK, P.A. Detection of microsatellite polymorphisms cloning. **Nucleic Acids Res.**, v.22, p.3257-3258,1994.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics.**, v. 20, p.176-183,1994.

### 3 Diversidade genética em cajuí (*Anacardium* spp.) por meio de caracteres morfoagronômicos

#### RESUMO

Cajuí é uma nomenclatura utilizada para designar plantas do gênero *Anacardium* que apresentam fruto (castanha) e pseudofruto (pedúnculo) pequenos. O cajuzeiro é uma planta nativa e de grande dispersão na região do litoral piauiense, com elevado valor ambiental e socioeconômico. A coleta, caracterização e avaliação da diversidade genética de acessos de cajuí são importantes para conservação e utilização deste recurso genético. Nesta perspectiva, este estudo teve por objetivo realizar a caracterização morfoagronômica, bem como avaliar a diversidade genética de 18 acessos de cajuí pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma do Cajuí da Embrapa Meio-Norte, por meio de 14 variáveis morfológicas e quatro químicas. Os acessos demonstraram ampla variação em relação às variáveis analisadas, apresentando características favoráveis ao consumo *in natura* e/ou ao processamento dos seus derivados. Nas estatísticas multivariadas, procedeu-se a análise de componentes principais (ACP), com os três primeiros componentes principais (CPs) explicando 81,68% da variância total apresentada pelos dados. O gráfico *biplot* obtido pela projeção tridimensional dos três primeiros CPs demonstrou a ampla dispersão dos acessos entre e dentro das populações, o que foi confirmado pelas análises de agrupamento pelo método UPGMA e pelo método de otimização de *Tocher*. A organização da diversidade genética pode estar relacionada, pelo menos em parte, à introdução de acessos provenientes de diferentes locais, por meio da seleção realizada pelo homem; e ao fluxo gênico. As informações obtidas neste estudo contribuíram com a geração de informação sobre a diversidade genética existente nos acessos, podendo vir a subsidiar futuros programas de melhoramento do cajuí.

**Palavras-chave:** banco de germoplasma, análise multivariada, vegetação litorânea

## **Genetic diversity in cashew (*Anacardium* spp.) by morpho-agronomic characters**

### **ABSTRACT**

Cashew is a nomenclature used to describe members of the genus *Anacardium*, which includes plants with small fruit (nuts) and pseudofruit (peduncle). The cashew tree is a native plant of great dispersion in the coastal region of Piauí and has high environmental and socio-economic value. The collection, characterization and evaluation of the genetic diversity in cashew accesses are important factors for conservation and use of this genetic resource. In this perspective, this study aimed to carry out the morpho-agronomic characterization, as well as to assess the genetic diversity, of 18 cashew accesses from the cashew Active Germplasm Bank at Embrapa Meio-Norte through 14 morphological and four chemical variables. The accesses have shown wide variation in relation to the variables analyzed such as favorable characteristics for fresh consumption and/or processing of their products. For the multivariate statistics, it was performed the analysis of the principal components (APC), with the first three principal components (PCs) explaining 81.68% of the total variance presented by the data. The *biplot* graph obtained by three-dimensional projection of the first three CPs demonstrated the wide dispersion of access between and within populations, which was confirmed by cluster analysis by UPGMA method and the method of *Tocher* optimization. The organization of the genetic diversity may be related, at least in part, to the introduction of access from different locations through the selection made by the man, and the effects of gene flow. The information obtained in this study contribute to the generation of information on the genetic diversity in access and may subsidize future cashew breeding programs.

**Keywords:** germplasm bank, multivariate analysis, coastal vegetation

### 3.1 INTRODUÇÃO

Cajuí é uma terminologia usada para caracterizar os indivíduos do gênero *Anacardium* com base no tamanho do fruto (castanha) e do pseudofruto (pedúnculo). Esta classificação é estabelecida pela indústria processadora de castanha de caju, que denomina cajuí aqueles que apresentam peso da castanha inferior a 3,33 g (CARBAJAL; SILVA JÚNIOR, 2003). Embora esta identificação tenha sido estabelecida apenas pela morfometria do fruto, a nomenclatura estende-se à planta, denominada cajuzeiro.

O cajuzeiro possui grande dispersão pelo território brasileiro, estendendo-se desde a Amazônia até as regiões Nordeste e Centro-Oeste. Por apresentar boa adaptabilidade aos diferentes tipos de solo, é característico tanto das regiões dos cerrados quanto na vegetação litorânea. Na região litorânea piauiense é observada intensa ocorrência de populações naturais de cajuzeiro (CRESPO; SOUZA, 2014).

O cajuí possui grande importância socioeconômica e ambiental, em especial para as populações locais é uma das principais, e por vezes única, fonte de renda no período da entressafra de culturas tradicionais. Apresenta características peculiares e promissoras tanto para o mercado de mesa, quanto para o processamento de seus derivados. O pedúnculo possui elevada qualidade nutritiva e apresenta na sua constituição vários tipos de minerais (cálcio, ferro e fósforo) e açúcares, bem como altos teores de vitamina C. Sendo bastante utilizados na culinária, como temperos e no preparo de doces, temperos, bebidas ou consumidos *in natura*. A castanha, após passar por um processamento primário denominado “torra” pode ser consumida na forma natural ou como ingrediente na fabricação de bolos e sorvetes (RUFINO et al., 2008; ALMEIDA, 2009).

No entanto, o aproveitamento do cajuzeiro ainda é pouco explorado do ponto de vista comercial, sendo as comunidades que vivem próximas às áreas de ocorrência da planta os principais agentes no processamento dos seus derivados, sendo todo o material proveniente das plantas fruto do extrativismo.

Neste cenário, faz-se necessário que a diversidade genética de cajuí da vegetação litorânea piauiense seja preservada e melhor avaliada. Uma das formas de conservação de material vegetal é o estabelecimento de bancos ativo de germoplasma (BAGs). No entanto, o estabelecimento de BAGs por si

só não é suficiente, e deve ser acompanhado por estudos de caracterização, quantificação da divergência genética e estabelecimento das relações entre os acessos, para que ações de coleta, conservação e possível utilização desta diversidade genética em futuros programas de melhoramento possam ser eficientes.

Neste intuito, descritores fenotípicos tornam-se ferramentas úteis, fornecendo informações necessárias à caracterização e quantificação da diversidade genética presente entre indivíduos através da utilização de técnicas multivariadas, como a análise de agrupamento e de componentes principais, tornando possível avaliar a diversidade genética e a importância dos caracteres estudados.

Deste modo, o presente estudo teve por objetivo realizar a caracterização morfoagronômica de 18 acessos do Banco Ativo de Germoplasma do Cajuí da Embrapa Meio Norte por meio de variáveis morfológicas e químicas.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Material Vegetal

Os dados informativos referentes à caracterização morfoagronômica foram obtidos durante a fase reprodutiva. Os acessos analisados foram provenientes do Banco Ativo de Germoplasma – BAG da EMBRAPA Meio-Norte, que se encontram distribuídos em dois campos experimentais: dezesseis provenientes do campo experimental da EMBRAPA Meio-Norte/UEP, no município de Parnaíba-PI; e dois no campo experimental da EMBRAPA Meio-Norte, no município de Teresina, com total de dezoito acessos (Tabela 1).

O campo experimental instituído na EMBRAPA Meio-Norte/UEP (Figura 1) está localizado no Município de Parnaíba, Estado do Piauí, na BR-343, km 35, zona rural a aproximadamente 17 km da cidade de Parnaíba. Correspondente às coordenadas geográficas variando de 3°04'49" a 3°06,04" de latitude sul e de 41°46'50" a 41°48'18" de longitude oeste (MELO et al., 2004).

O campo experimental pertencente à Embrapa Meio-Norte, localiza-se no Município de Teresina, Estado do Piauí. Esta localização corresponde às coordenadas geográficas 5°01'53" latitude sul e 42°47'54" longitude oeste, com altitude média de 70 m (MELO FILHO; MEDEIROS; JACOMINE, 1980).



Figura1 - Banco Ativo de Germoplasma de Cajú pertencente à EMBRAPA Meio-Norte/UEP, Parnaíba- PI. Fonte: Autora.

Tabela 1 - Identificação da localização dos acessos de cajuí (*Anacardium* spp.) pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma do Cajuí da Embrapa Meio Norte, município de Teresina-PI e da UEP, município de Parnaíba - PI, usados na análise de diversidade genética baseada em marcadores morfoagronômicos e análises

<b>GENÓTIPO</b>	<b>ESPÉCIE</b>	<b>LOCAL DE COLETA</b>	<b>MUNICÍPIO</b>	<b>INSTITUIÇÃO</b>
<b>BGCA 22</b>	<i>Anacardium</i> sp.	Povoado Labino	Ilha Grande	Embrapa Meio- Norte/UEP
<b>BGCA 23</b>	<i>Anacardium</i> sp.	Povoado Baixão	Ilha Grande	Embrapa Meio- Norte/UEP
<b>BGCA 24</b>	<i>Anacardium</i> sp.	Povoado Cal	Ilha Grande	Embrapa Meio- Norte/UEP
<b>BGCA 25</b>	<i>Anacardium</i> sp.	Pedra do Sal	Parnaíba	Embrapa Meio- Norte/UEP
<b>BGCA 26</b>	<i>Anacardium</i> sp.	Pedra do Sal	Parnaíba	Embrapa Meio- Norte/UEP
<b>BGCA 27</b>	<i>Anacardium</i> sp.	Pedra do Sal	Parnaíba	Embrapa Meio- Norte/UEP
<b>BGCA 28</b>	<i>Anacardium</i> sp.	Fazenda Bom Jesus	Parnaíba	Embrapa Meio- Norte/UEP
<b>BGCA 29</b>	<i>Anacardium</i> sp.	Fazenda Bom Jesus	Parnaíba	Embrapa Meio- Norte/UEP
<b>BGCA 30</b>	<i>Anacardium</i> sp.	Povoado Labino	Ilha grande	Embrapa Meio- Norte/UEP
<b>BGCA 31</b>	<i>Anacardium</i> sp.	Embrapa/UEP	Parnaíba	Embrapa Meio- Norte/UEP
<b>BGCA 32</b>	<i>Anacardium</i> sp.	Embrapa/UEP	Parnaíba	Embrapa Meio- Norte/UEP
<b>BGCA 33</b>	<i>Anacardium</i> sp.	Fazenda Bom Jesus	Parnaíba	Embrapa Meio- Norte/UEP
<b>BGCA 34</b>	<i>Anacardium</i> sp.	Pedra do Sal	Parnaíba	Embrapa Meio- Norte/UEP
<b>BGCA 35</b>	<i>Anacardium</i> sp.	Fazenda Bom Jesus	Parnaíba	Embrapa Meio- Norte/UEP
<b>BGCA 36</b>	<i>Anacardium</i> sp.	Embrapa/UEP	Parnaíba	Embrapa Meio- Norte/UEP
<b>BGCA 37</b>	<i>Anacardium</i> sp.	Embrapa/UEP	Parnaíba	Embrapa Meio- Norte/UEP
<b>BGCA 45</b>	<i>Anacardium</i> sp.	Povoado Labino	Ilha Grande	Embrapa Meio-Norte Teresina
<b>BGCA 48</b>	<i>Anacardium</i> sp.	Fazenda Bom Jesus	Parnaíba	Embrapa Meio-Norte Teresina

### 3.2.2 Coleta de dados

A caracterização da diversidade genética foi realizada através de técnicas de análise multivariada, considerando 14 descritores quantitativos do cajueiro listados pelo International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), atual Bioversity International (IBPGR, 1986). Sendo que destes, três são referentes à inflorescência; cinco ao pedúnculo; quatro à castanha e dois ao hábito de crescimento. Os caracteres analisados estão representados na Figura 2.

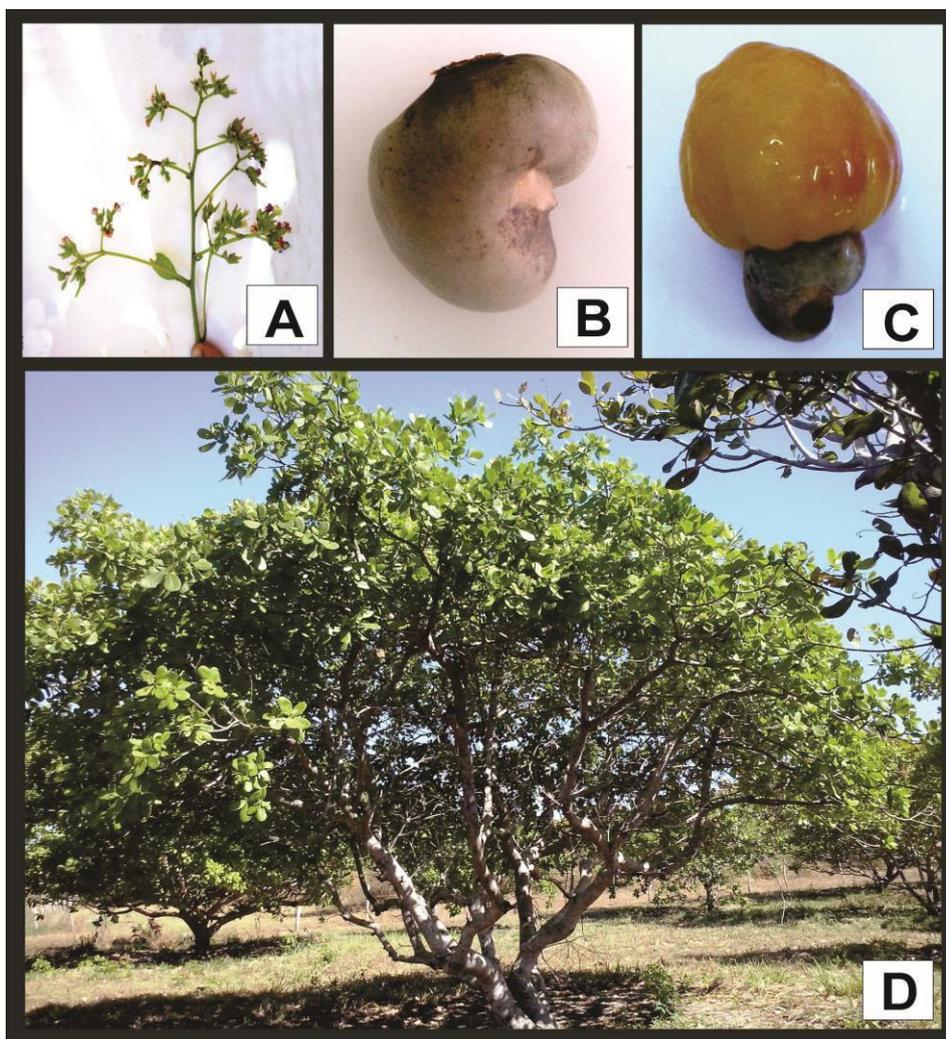


Figura 2 - Caracteres analisados na avaliação morfoagronômica de cajuí. A – inflorescência. B – fruto (castanha). C – fruto e pseudofruto (pedúnculo). D – planta de cajuí.  
Fonte: Autora.

A descrição das variáveis mensuradas segue abaixo:

1. **Comprimento da inflorescência (CIN)**: medida de dez inflorescências, tomadas ao acaso no período de florescimento mais intenso, com auxílio de régua graduada em centímetros.
2. **Largura máxima da inflorescência (LIN)**: distância máxima entre os ramos da inflorescência, com auxílio de régua graduada em centímetros.
3. **Número total de ramificações da inflorescência (NRIN)**: contagem do número de inflorescências em relação ao eixo principal.
4. **Comprimento do pedúnculo (CPE)**: distância a partir do ápice até a base, com auxílio de paquímetro digital, e medidas expressas em centímetros.
5. **Diâmetro do pedúnculo (DPE)**: valor tomado da região central, localizada entre o ápice e a base do pedúnculo, com auxílio de paquímetro digital, e medidas expressas em centímetros.
6. **Diâmetro da base do pedúnculo (DBPE)**: valor tomado da base do pedúnculo, com auxílio de paquímetro digital, e medidas expressas em centímetros.
7. **Diâmetro do ápice do pedúnculo (DAPE)**: valor tomado do ápice do pedúnculo, com o auxílio de um paquímetro digital, com medidas expressas em centímetros.
8. **Peso do pedúnculo (PPE)**: peso médio de dez pedúnculos tomados ao acaso, a avaliação foi realizada com auxílio de uma balança graduada em gramas com três casas decimais.
9. **Comprimento da castanha (CCA)**: distância a partir do ponto de fixação para o ápice, com auxílio de paquímetro digital, valores apresentados em centímetros.
10. **Largura da castanha (LCA)**: a distância máxima entre os ombros, com o auxílio de um paquímetro digital, resultados apresentados em centímetros.
11. **Espessura da castanha (ECA)**: distância máxima entre os lados, com o auxílio de um paquímetro digital, valores apresentados em centímetros.
12. **Peso da castanha (PCA)**: peso médio de dez castanhas tomadas ao acaso, a avaliação foi realizada com auxílio de uma balança graduada em gramas com três casas decimais.
13. **Altura máxima da planta (AMPL)**: medida do nível do solo à inserção da gema apical, usando uma régua graduada em metros.

14. **Diâmetro médio da copa sentidos N-S e W-E (DMC):** medida tomada pela média entre o maior e o menor diâmetro da copa, dando um indicativo da área da copa da planta, em metros.

Estudos de repetibilidade estabelecem a realização de 10 medições, por indivíduo, para cada uma das características em estudo, como número satisfatório para se obter médias com confiabilidade igual ou superior a 90% (PESSONI; CRUZ, 2005). Os dados referentes à inflorescência foram coletados entre os meses de junho a setembro de 2014. Foram realizadas medidas de dez inflorescências, escolhidas ao acaso e no período de floração mais intensa. Os dados foram aferidos com base no estabelecido na Figura 3.

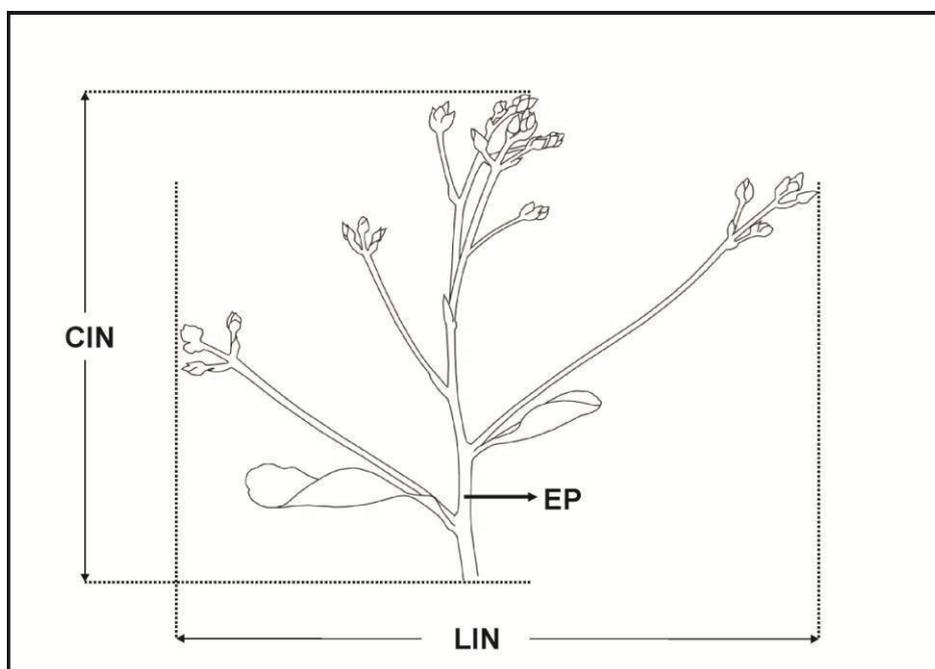


Figura 3 - Desenho esquemático da inflorescência de cajuí indicando as regiões de aferições baseadas nos descritores para caju estabelecidos pelo IBPGR (1986). **CIN:** comprimento da inflorescência; **LIN:** largura máxima da inflorescência; **EP:** eixo principal. Fonte: Autora.

Todos os caracteres referentes à castanha representam medidas de dez frutos de cada acesso, colhidos ao acaso no período de frutificação mais intensa. De modo semelhante, foram realizadas as avaliações referentes ao pedúnculo. Os dados para castanha e pedúnculo foram tomados por base no estabelecido na Figura 4.

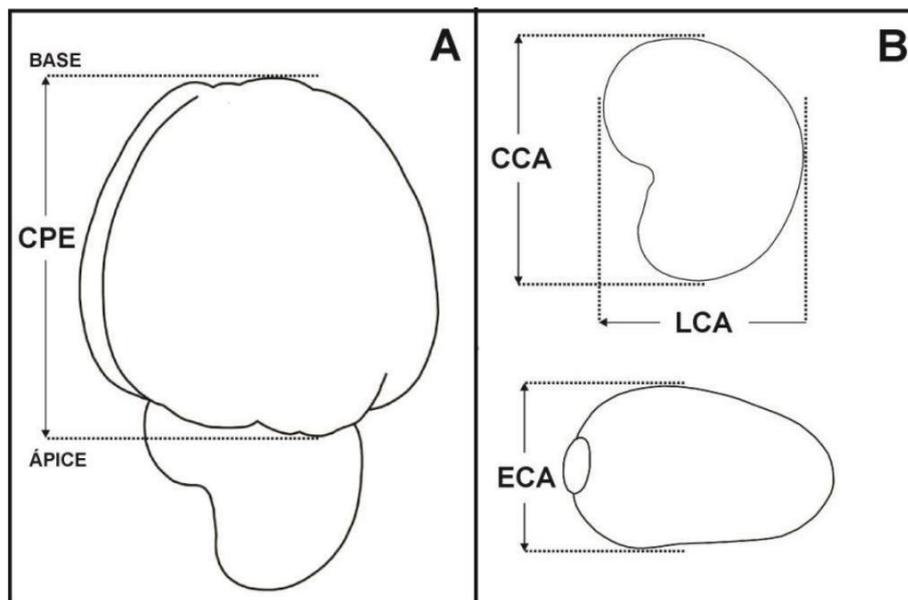


Figura 4 - Desenhos esquemáticos de cajuí indicando as regiões de aferições baseadas nos descritores para caju estabelecidos pelo IBPGR (1986). (A) referentes ao pedúnculo: **CPE**: comprimento do pedúnculo; (B) referentes à castanha: **CCA**: comprimento da castanha; **LCA**: largura da castanha; **ECA**: espessura da castanha. Fonte: Autora.

Para as variáveis referentes ao porte da planta foi realizada medida em apenas um indivíduo por acesso.

De modo complementar, foram realizadas determinações químicas a partir do suco do pedúnculo dos cajuís, o qual foi homogeneizado e obtido triplicatas para a realização das análises. As variáveis analisadas foram: pH; Acidez Total Titulável – ATT; Sólidos Solúveis Totais - SST (°Brix); e relação SST/ATT.

O valor do pH foi obtido por meio de leituras em phmetro. A ATT foi obtida por titulometria, usando NaOH a 0,1 N e solução de fenolftaleína como indicador, com resultado final expresso em teor de ácido cítrico (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

A determinação dos SST foi realizada por meio de leitura em refratômetro digital de bancada graduado de 0 a 45° Brix e os resultados expressos em porcentagem do °Brix com leitura no próprio equipamento. A relação SST/ATT foi obtida por meio da razão dos sólidos solúveis totais pela acidez total titulável.

As análises químicas foram executadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa Meio-Norte, Teresina - PI.

### 3.2.3 Análise dos dados

No estudo da divergência genética para os dados morfoagronômicos foram empregadas análises multivariadas, baseada em componentes principais, métodos de agrupamento de otimização de *Tocher* e pelo método UPGMA.

Uma análise preliminar foi realizada para verificar a correlação entre as variáveis estudadas, para tanto foi construída uma matriz de correlação, com média zero e variância 1,0, tendo por base o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ). Este coeficiente mede o grau de correlação linear entre duas variáveis quantitativas, sendo bastante empregado em análise de componentes principais. Trata-se de um índice adimensional, em que os valores assumem o intervalo entre -1,0 e 1,0; sendo considerada correlação perfeita e positiva; perfeita e negativa; e ausência de correlação linear para  $r = +1,0$ ;  $r = -1,0$  e  $r = 0$ , respectivamente. Valores intermediários podem ser assumidos, onde o sinal irá representar a direção (negativa ou positiva) e o valor indicará a magnitude da correlação entre as variáveis (FIGUEIREDO FILHO; SILVA JÚNIOR, 2009; PUTH; NEUHÄUSER; RUXTON, 2014).

Em relação à magnitude do coeficiente, valores até 0,4 foram consideradas correlações fracas; entre 0,4 a 0,7 moderadas; e maiores que 0,7, correlação forte.

De posse da matriz de correlação foram obtidos os autovalores e autovetores associados e procedeu-se à Análise de Componentes Principais (ACP). Tendo por base os dados da análise multivariada, foi construída uma representação gráfica *biplot* no espaço tridimensional, no qual foram plotados o primeiro, o segundo e o terceiro componentes principais. Essas análises foram realizadas por meio do PROC PRINCOMP do software SAS 9.0 (SAS, 2002).

Adicionalmente, foram realizadas análises de agrupamento para verificar a relação entre os acessos pelo método hierárquico, usando a distância média entre grupos UPGMA, por meio do programa PAST v.1.34 (HAMMER et al., 2001), e pelo método de otimização de *Tocher*, realizada no programa computacional Genes versão 2013.5.1 (CRUZ, 2013).

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Caracterização dos acessos e relação entre as variáveis morfológicas

Em geral, foi observada uma elevada variação para as características analisadas. A Figura 5 demonstra a ampla diversidade fenotípica dos caracteres relacionados a fruto (castanha) e pseudofruto (pedúnculo).

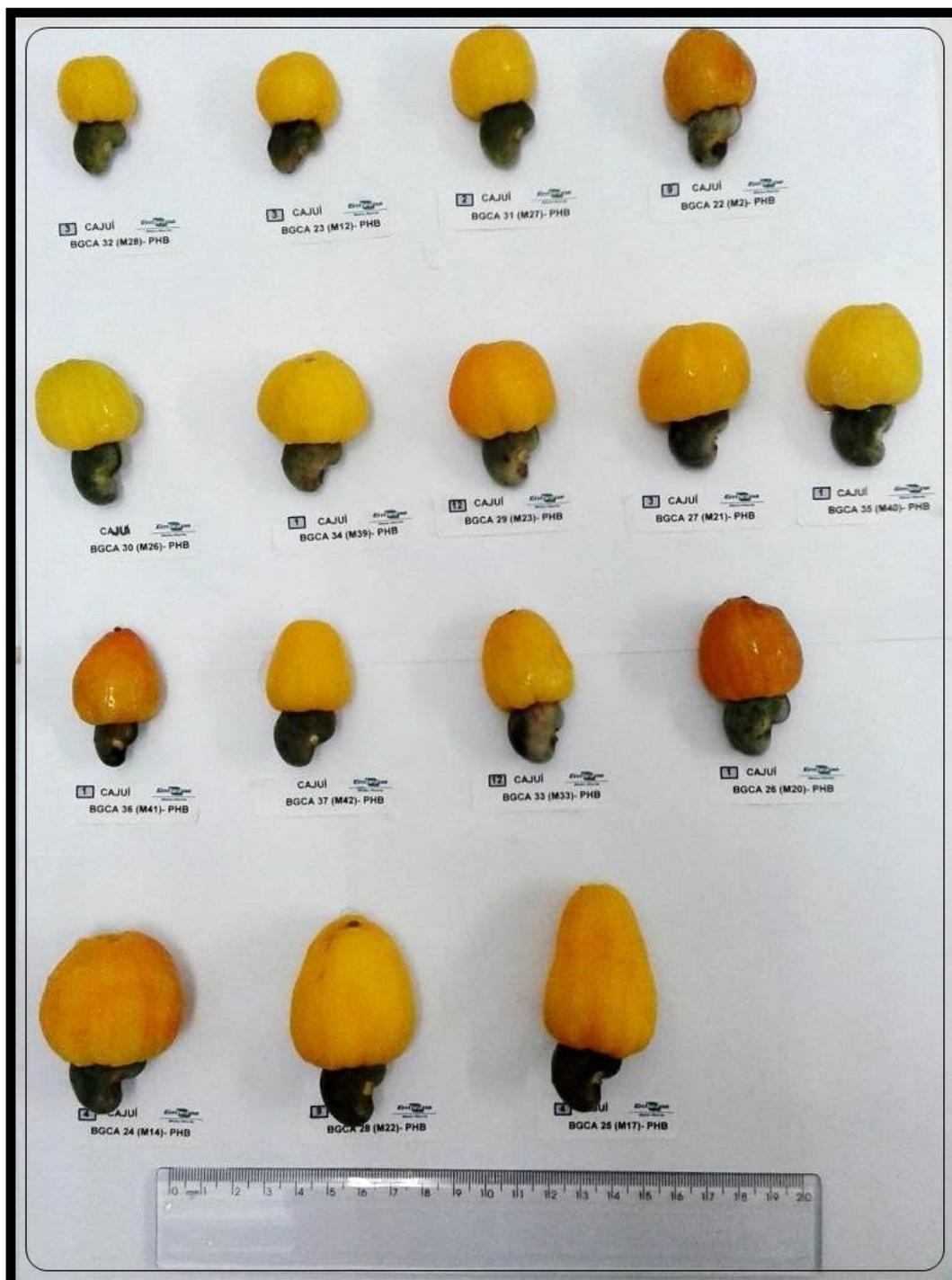


Figura 5 - Diversidade fenotípica de fruto e pseudofruto de acessos de *Anacardium* ssp., provenientes do BAG do Cajuí da Embrapa Meio Norte/UEP, Parnaíba-PI. Fonte: Autora.

Em relação ao caractere peso da castanha (PCA) observou-se variação entre 1,61 g a 3,93 g com média de 3,08 g, sendo classificados como cajuís de acordo com o critério da agroindústria. A exceção foi o acesso BGCA48 que apresentou PCA igual a 8,61g (Anexo A).

Para o peso do pedúnculo (PPE) observou-se valores variando de 7,79 g (BGCA23) a 96,05 g. O elevado valor de desvio padrão (Anexo A) apresentado para esta variável se deve ao fato de que mais de 16% dos acessos apresentam PPE inferior a 10 g, e elevados valores desta variável para os acessos BGCA28 e BGCA48. As demais variáveis referentes ao pedúnculo também apresentam uma ampla variação, com intervalos de 1,77 cm – 6,23 cm (comprimento do pedúnculo - CPE); 2,01 cm – 5,36 cm (diâmetro do pedúnculo - DPE); 1,51 cm – 4,70 cm (diâmetro da base do pedúnculo – DBPE) e 1,91 cm – 5,62 cm (diâmetro do ápice do pedúnculo – DAPE). De acordo com estes dados, pôde-se afirmar que o caráter pedúnculo apresenta uma grande variabilidade genética.

Também foi possível observar que o caractere castanha estar fortemente relacionado ao caractere pedúnculo, a análise da Tabela 2 demonstra que as variáveis relacionadas a esses dois caracteres morfológicos estão positivamente correlacionadas entre si.

Os caracteres relacionados à inflorescência apresentaram uma ampla variação. Observando-se intervalos de 12,50 a 34,80 cm; 9,45 a 28,90 cm e 6,80 a 11,10 cm para comprimento da inflorescência (CIN), largura máxima da inflorescência (LIN) e número total de ramificações da inflorescência (NRIN), respectivamente (Anexo A). Observou-se uma correlação alta e positiva entre as variáveis referentes à inflorescência, confirmando uma relação já esperada, em que inflorescências maiores e mais largas também apresentaram o maior número de ramificações (Tabela 2). No entanto, apenas correlações baixas e negativas foram encontradas entre estas variáveis e as relacionadas à castanha e pedúnculo.

Plantas maiores exibiram as maiores copas, visto que a correlação entre altura máxima da planta (AMPL) e diâmetro médio da copa (DMC) é alta e positiva. Alta variabilidade pode ser observada para este caráter com amplitude de variação apresentada pelas plantas amostradas de 3,10 a 8,40 m e 4,70 a

12,05 m para altura máxima da planta (AMPL) e diâmetro médio da copa (DMC), respectivamente.

**Tabela 2** –Matriz de correlações entre os dados morfométricos e variáveis químicas, avaliados de 18 acessos de *Anacardium* ssp., provenientes do

Banco Ativo de Germoplasma do Cajú da Embrapa Meio Norte, município de Teresina-PI e da UEP, município de Parnaíba – PI, 2015

	CIN	LIN	NRIN	CPE	DPE	DBPE	DAPE	PPE	CCA	LCA	ECA	PCA	AMPL	DMC	Ph	SST	ATT	SST/ATT T	
<b>CIN</b>	1,00	<b>0,71</b>	0,68	-0,25	-0,19	-0,14	-0,28	-0,32	-0,14	-0,13	-0,03	-0,23	0,05	-0,19	-0,06	0,07	0,12	-0,08	
<b>LIN</b>		1,00	<b>0,76</b>	-0,17	-0,04	-0,04	-0,15	-0,23	-0,06	-0,09	-0,20	-0,22	-0,11	-0,21	-0,32	-0,30	0,27	-0,41	
<b>NRIN</b>			1,00	-0,33	-0,18	-0,18	-0,25	-0,34	-0,21	-0,21	-0,21	-0,31	-0,05	-0,19	-0,19	-0,04	0,17	-0,22	
<b>CPE</b>				1,00	<b>0,87</b>	<b>0,77</b>	<b>0,93</b>	<b>0,91</b>	<b>0,88</b>	<b>0,88</b>	0,69	<b>0,81</b>	-0,01	0,13	0,41	-0,23	-0,03	0,31	
<b>DPE</b>					1,00	<b>0,96</b>	<b>0,96</b>	<b>0,95</b>	<b>0,90</b>	<b>0,90</b>	<b>0,76</b>	<b>0,89</b>	-0,12	0,04	0,44	-0,31	-0,08	0,33	
<b>DBPE</b>						1,00	<b>0,88</b>	<b>0,92</b>	<b>0,85</b>	<b>0,85</b>	<b>0,78</b>	<b>0,89</b>	-0,22	-0,05	0,48	-0,22	-0,14	0,38	
<b>DAPE</b>							1,00	<b>0,96</b>	<b>0,94</b>	<b>0,94</b>	<b>0,79</b>	<b>0,91</b>	-0,02	0,11	0,47	-0,25	-0,06	0,35	
<b>PPE</b>								1,00	<b>0,91</b>	<b>0,90</b>	<b>0,82</b>	<b>0,93</b>	-0,12	0,05	0,56	-0,16	-0,17	0,46	
<b>CCA</b>									1,00	<b>0,98</b>	<b>0,88</b>	<b>0,95</b>	-0,19	-0,13	0,61	-0,12	-0,17	0,46	
<b>LCA</b>										1,00	<b>0,89</b>	<b>0,95</b>	-0,15	-0,12	0,58	-0,09	-0,14	0,44	
<b>ECA</b>											1,00	<b>0,94</b>	-0,23	-0,26	<b>0,73</b>	0,12	-0,20	0,65	
<b>PCA</b>												1,00	-0,21	-0,13	0,68	-0,03	-0,23	0,58	
<b>AMPL</b>													1,00	<b>0,89</b>	-0,30	-0,18	0,19	-0,35	
<b>DMC</b>															1,00	-0,27	-0,33	0,11	-0,32
<b>pH</b>																1,00	0,42	<b>-0,77</b>	<b>0,94</b>
<b>SST</b>																	1,00	-0,40	0,43
<b>ATT</b>																		1,00	<b>-0,75</b>
<b>SST/ATT</b>																			1,00

CIN: comprimento da inflorescência (cm); LIN: largura máxima da inflorescência (cm); NRIN: número total de ramificações da inflorescência; CPE: comprimento do pedúnculo (cm); DPE: diâmetro do pedúnculo (cm); DBPE: diâmetro da base do pedúnculo (cm); DAPE: diâmetro do ápice do pedúnculo (cm); PPE: peso do pedúnculo (g); CCA: comprimento da castanha (cm); LCA: largura da castanha (cm); ECA: espessura da castanha (cm); PCA: peso da castanha (g); AMPL: altura máxima da planta (m); DMC: diâmetro médio da copa sentidos: N-S e W-E (m); SST: Sólidos Solúveis Totais (°Brix); pH: potencial hidrogeniônico; ATT: Acidez Total Titulável (%). Valores em negrito indicam correlação forte

O pH apresentou correlação alta e negativa com a acidez total titulável (ATT), deste modo, quanto menor o pH, maior será a ATT e, conseqüentemente, mais ácido será o pedúnculo. Os valores apresentados para ATT exibem variação de 0,2 a 2,1% e para pH de 2,35 a 5,42, obtendo valores médios de 3,34 e 0,78% para pH e ATT, respectivamente (Anexo A).

Os valores obtidos para sólidos solúveis totais (SST), medidos em °Brix, apresentaram variação de 10,20° a 19,90° para os acessos BGCA28 e BGCA23, respectivamente, com média de 14,59° (Anexo A).

Para a relação SST/ATT, os valores encontrados demonstraram uma ampla variação para este caráter, assumindo valores no intervalo de 5,71 a 80,50, com média de 28,07.

A razão SST/ATT apresentou correlação alta e positiva com pH e alta e negativa com ATT. No entanto, apenas correlação positiva e moderada foi observada entre SST/ATT e SST (Tabela 2). Pôde-se constatar que o fator que mais colabora com o sabor e qualidade dos pedúnculos de cajuí é a acidez, a qual apresenta uma grande variabilidade.

De modo geral, as 18 variáveis analisadas apresentaram altas correlações, o que valida o uso da ACP na análise de diversidade genética em cajuí.

### 3.3.2 Análise de Componentes Principais (ACP)

De acordo com a ACP dos acessos com base nos descritores morfológicos e químicos, verificou-se a necessidade de três componentes principais (CPs) na explicação de 81,68% da variabilidade apresentada pelos acessos. Na análise das variáveis com maiores escores na constituição do CP1, observou-se que os caracteres relacionados ao tamanho do fruto (castanha + pedúnculo) apresentaram uma combinação positiva na constituição deste componente. Na determinação do CP2 observou-se uma associação entre as variáveis químicas, com uma combinação negativa entre pH, SST e SST/ATT, e positiva para ATT. As variáveis relacionadas à inflorescência arranjam-se de forma positiva na constituição do CP3 (Tabela 3).

**Tabela 3** - Estimativa dos autovalores e porcentagem de variância associados aos três primeiros componentes principais, obtidos a partir da matriz de correlação entre variáveis morfométricas e químicas avaliados a partir de 18 acessos de *Anacardium ssp.*, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma do Cajuí da Embrapa Meio Norte, município de Teresina-PI e da UEP, município de Parnaíba-PI

Componentes Principais	CP1	CP2	CP3
Autovalor	9,06	3,08	2,56
Variância (%)	50,35	17,11	14,22
Variância acumulada (%)	50,35	67,46	81,68
Variáveis <sup>a</sup>	CR <sup>b</sup>		
CIN	- 0,087	- 0,014	<b>0,470*</b>
LIN	- 0,085	0,167	<b>0,534*</b>
NRIN	- 0,113	0,036	<b>0,484*</b>
CPE	<b>0,290*</b>	0,181	- 0,036
DPE	<b>0,305*</b>	0,177	0,072
DBPE	<b>0,298*</b>	0,109	0,100
DAPE	<b>0,312*</b>	0,177	- 0,005
PPE	<b>0,320*</b>	0,100	- 0,031
CCA	<b>0,318*</b>	0,063	0,098
LCA	<b>0,316*</b>	0,070	0,091
ECA	<b>0,300*</b>	- 0,081	0,099
PCA	<b>0,326*</b>	- 0,001	0,026
AMPL	- 0,070	0,295	- 0,270
DMC	- 0,032	0,334	- 0,356
pH	0,233	<b>- 0,358*</b>	- 0,003
SST	- 0,017	<b>- 0,434*</b>	- 0,049
ATT	- 0,096	<b>0,399*</b>	0,108
SST/ATT	0,199	<b>- 0,405*</b>	- 0,038

(a) CIN: comprimento da inflorescência; LIN: largura máxima da inflorescência; NRIN: número total de ramificações da inflorescência; CPE: comprimento do pedúnculo; DPE: diâmetro do pedúnculo; DBPE: diâmetro da base do pedúnculo; DAPE: diâmetro do ápice do pedúnculo; PPE: peso do pedúnculo; CCA: comprimento da castanha; LCA: largura da castanha; ECA: espessura da castanha; PCA: peso da castanha; AMPL: altura máxima da planta; DMC: diâmetro médio da copa sentidos: N-S e W-E; brix: Sólidos Solúveis Totais - SST; pH: potencial hidrogeniônico; ATT: Acidez Total Titulável.

(b) CR: Contribuição relativa de cada variável para a variância apresentada por cada componente principal.

\* variáveis consideradas na interpretação de cada componente principal.

Um gráfico *biplot* foi construído plotando-se os três primeiros componentes principais em um espaço tridimensional, a análise gráfica em relação a estes três CPs permitiu a caracterização dos acessos explicando mais de 80% dos dados (Figura 6).

De acordo com o gráfico, há uma ampla dispersão dos acessos, indicando elevada diversidade local. A maioria dos acessos se caracterizou por apresentar valores moderados a baixos para os caracteres relacionados a pedúnculo e castanha, e moderados a elevados para as variáveis pH, SST e

SST/ATT. Também é possível observar que algumas variáveis apresentam uma maior importância na explicação dos resultados apresentados por alguns acessos.

Os acessos BGCA34 e BGCA45 são similares, e caracterizam-se por, apresentar valores elevados para a variável ATT e baixos para pH, SST e SST/ATT.

Os acessos BGCA22 e BGCA26 destacam-se pelos caracteres químicos, apresentando elevados valores de pH, SST e SST/ATT, e baixos valores de ATT, caracterizando-se como excelentes candidatos a seleção de genótipos para o aproveitamento *in natura*. Um alto valor da relação SST/ATT é uma qualidade favorável tanto para o aproveitamento dos frutos *in natura* quanto para o processamento na indústria. Portanto, estes acessos têm um amplo potencial de aproveitamento.

Os acessos BGCA24, BGCA25 e BGCA28 são semelhantes entre si, caracterizam-se pela alta acidez e baixo grau de doçura, visto que, apresentaram elevados valores de ATT, e baixos valores das variáveis pH, SST e da relação SST/ATT. Também apresentam elevados valores dos caracteres relacionados ao tamanho do fruto (castanha + pedúnculo), com o BGCA28 apresentando uma maior preponderância das variáveis relacionadas ao pedúnculo.

O acesso BGCA48 foi, pelo gráfico, o mais divergente em relação aos demais, devido, principalmente, às características relacionadas à castanha (PCA e ECA).

A análise das médias, ACP e gráfico *biplot* permitiram uma melhor caracterização dos acessos estudados. De modo complementar, para visualizar o agrupamento entre estes por meio da similaridade genética, foram realizadas duas análises de agrupamento; um método de agrupamento de otimização (Método de *Tocher*) e um hierárquico (UPGMA).

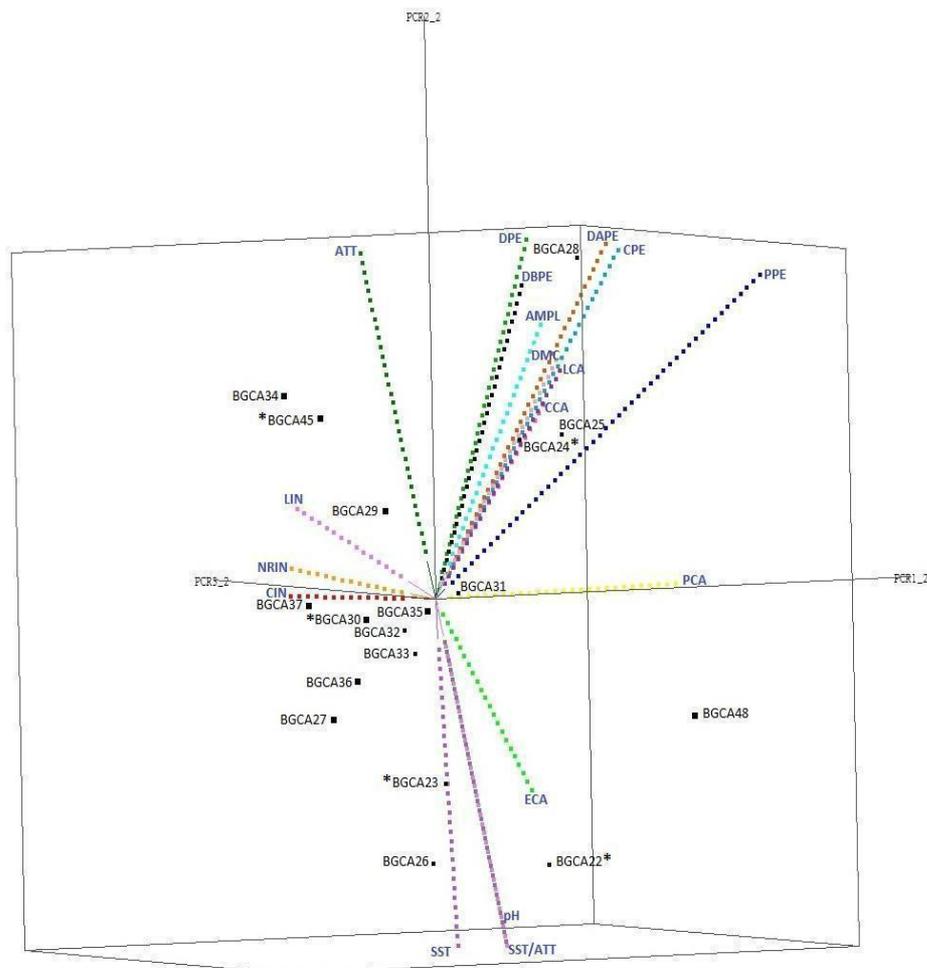


Figura 6 - Representação gráfica biplot da dispersão dos acessos analisados, entre os três primeiros componentes principais para as variáveis morfoagronômicas avaliadas em 18 acessos de *Anacardium ssp.*, provenientes dos BAG do Cajuí da Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI e da UEP, município de Parnaíba-PI. CIN: comprimento da inflorescência; LIN: largura máxima da inflorescência; NRIN: número total de ramificações da inflorescência; DPE: diâmetro do pedúnculo; DBPE: diâmetro da base do pedúnculo; DAPE: diâmetro do ápice do pedúnculo; PPE: peso do pedúnculo; CCA: comprimento da castanha; LCA: largura da castanha; ECA: espessura da castanha; PCA: peso da castanha; AMPL: altura máxima da planta; DMC: diâmetro médio da copa sentidos: N-S e W-E; brix: Sólidos Solúveis Totais - SST; pH: potencial hidrogeniônico; ATT: Acidez Total Titulável. \* acessos coletados no município de Ilha Grande

### 3.3.3 Análise da diversidade genética

A distância Euclidiana média entre todos os pares de acessos foi de 1,42. Por meio da análise das estimativas de distâncias pôde-se observar que existe grande dissimilaridade genética dentro da mesma região geográfica e que acessos provenientes de localidades diferentes podem ser bastante similares. Como comprovado pelas distâncias Euclidiana máxima e mínima entre os acessos: a distância Euclidiana mínima foi 0,42, entre os acessos

BGCA30, coletado no município de Ilha Grande, e BGCA35, proveniente do município de Parnaíba; a distância máxima estimada foi 3,23 entre os acessos BGCA48 e BGCA32, ambos procedentes do município de Parnaíba.

O acesso BGCA48 foi o mais divergente, apresentando as maiores distâncias entre todos os pares de acessos, confirmando a maior dispersão apresentada pelo gráfico *Biplot*.

Por meio dos caracteres para divergência de acordo com Singh (1981), verificou-se que das 18 variáveis analisadas, quatro contribuíram com 92,32% para a divergência genética entre os acessos, sendo elas: a relação SST/ATT (54,50%); peso do pedúnculo (36,79%) e duas relacionadas à inflorescência: comprimento da inflorescência (4,36%) e largura máxima da inflorescência (2,67%) (Tabela 4).

Tabela 4 - Contribuição relativa dos caracteres para divergência genética entre acessos de *Anacardium* spp., com base nos descritores morfológicos e químicos, por meio do método de SINGH (1981)

VARIÁVEL	S.j	(%)
Comprimento da inflorescência	16465,58	4,36
Largura máxima da inflorescência	10060,07	2,67
Número total de ramificações da inflorescência	523,13	0,14
Comprimento do pedúnculo	441,85	0,12
Diâmetro do pedúnculo	198,70	0,05
Diâmetro da base do pedúnculo	175,37	0,05
Diâmetro do ápice do pedúnculo	251,66	0,07
Peso do pedúnculo	138867,04	36,79
Comprimento da castanha	71,04	0,02
Largura da castanha	39,69	0,01
Espessura da castanha	20,33	0,01
Peso da castanha	707,26	0,19
Altura máxima da planta	676,17	0,18
Diâmetro médio da copa sentidos: N-S e W-E	1414,94	0,37
pH	143,75	0,04
Sólidos Solúveis Totais	1611,17	0,43
Acidez Total Titulável	66,94	0,02
SST/ATT	205686,48	54,50

### 3.3.4 Análises de agrupamento

O algoritmo de otimização de *Tocher* permitiu o agrupamento dos acessos em dois grupos considerando os 18 caracteres analisados, com distância intergrupos de 2,88. O grupo I reuniu quase todos os acessos, com uma distância intragrupo de 1,24. Excetuando-se o BGCA48, que se

diferenciou dos demais formando um agrupamento único (Tabela 5), o que já era previsto, pois este acesso apresentou características fenotípicas bem próximas ao caju comum.

Observou-se elevada heterogeneidade entre os acessos pertencentes ao grupo I, o que é resultado da grande divergência apresentada pelo acesso BGCA48 em relação aos demais, observada pelo gráfico de dispersão *biplot*, e distância Euclidiana média par a par. Neste método de agrupamento, a formação dos grupos é direcionada pela maior distância entre as menores distâncias par a par (maior entre os mínimos), como o acesso BGCA48 foi muito divergente e apresentou a maior distância entre os mínimos (2,3823), este valor é usado como medida intergrupo. Neste caso, por ser um valor alto, pode ocorrer que acessos diferentes geneticamente sejam agrupados no mesmo grupo.

Por este motivo, de modo complementar, foi realizado o reagrupamento dos acessos do grupo I, por meio de uma segunda análise de agrupamento empregando o método de *Tocher*. O novo valor para a maior distância entre os mínimos foi de 1,506, bem menor que no agrupamento anterior, possibilitando a diminuição na heterogeneidade dos acessos intragrupo.

De acordo com este agrupamento, houve a discriminação de cinco grupos, onde o grupo I<sub>a</sub> reuniu o maior número de representantes (61%) das duas localidades geográficas analisadas. No entanto, a formação de novos grupos, confirmou que a elevada divergência apresentada pelo acesso BGCA48, mascarava a variabilidade apresentada pelos demais acessos. O grupo I<sub>b</sub> também foi constituído por indivíduos pertencentes às duas localidades, sendo formado por três acessos. Os grupos I<sub>c</sub>, I<sub>d</sub> e I<sub>e</sub> foram formados por apenas um acesso cada (Tabela 5).

Tabela 5 – Agrupamento dos 18 acessos de *Anacardium ssp.*, procedentes pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma do Cajuí da Embrapa Meio Norte, município de Teresina-PI e da UEP, município de Parnaíba-PI, obtido a partir do método de otimização de Tocher por meio das variáveis morfoagronômicas e químicas avaliadas

GRUPO	ACESSOS				D intragrupo	D intergrupo
<b>I</b> (IG + PHB)	BGCA22, BGCA26, BGCA30, BGCA34, BGCA45	BGCA23, BGCA27, BGCA31, BGCA35	BGCA24, BGCA28, BGCA32, BGCA36	BGCA25, BGCA29, BGCA33, BGCA37	1,24	D <sub>I,II</sub> = 2,88
<b>Ia</b> (IG + PHB)	BGCA23, BGCA31, BGCA35	BGCA26, BGCA32, BGCA36	BGCA27, BGCA33, BGCA37	BGCA30, BGCA34	1,27	D <sub>Ia,Ib</sub> = 2,02 D <sub>Ia,Ic</sub> = 1,99 D <sub>Ia,Id</sub> = 1,54 D <sub>Ia,Ie</sub> = 1,72
<b>Ib</b> (IG + PHB)	BGCA24	BGCA25	BGCA28		1,15	D <sub>Ib,Ic</sub> = 1,81 D <sub>Ib,Id</sub> = 1,83 D <sub>Ib,Ie</sub> = 1,94
<b>Ic</b> (IG)	BGCA45				–	D <sub>Ic,Id</sub> = 1,52 D <sub>Ic,Ie</sub> = 2,21
<b>Id</b> (PHB)	BGCA29				–	D <sub>Id,Ie</sub> = 1,89
<b>Ie</b> (IG)	BGCA22				–	
<b>II</b>	BGCA48				–	

\_ : Não existem distância intragrupo, pois o grupo é constituído por apenas um acesso.  
 $\Theta = 2,3823$ , valor adotado como critério global de agrupamento.  $\Theta = 1,506$ , valor adotado como critério local de agrupamento entre os acessos do grupo I.

A análise de agrupamento pelo método UPGMA para 18 acessos de cajuí, por meio das 14 variáveis morfológicas e quatro químicas, está representada na Figura 7.

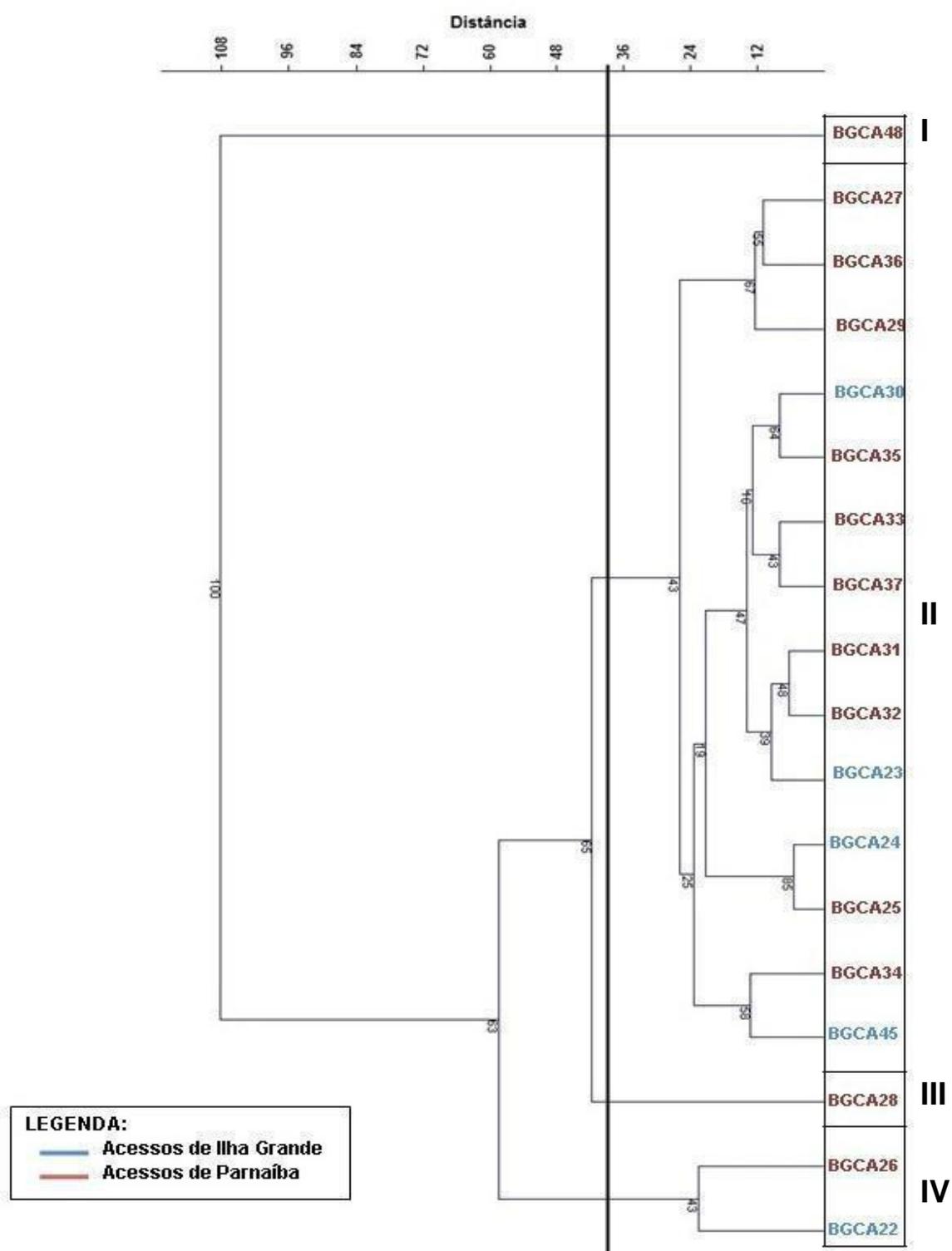


Figura 7 – Dendrograma resultante da análise multivariada de 18 acessos de *Anacardium* ssp. com base em descritores morfológicos e químicos, pelo método de agrupamento UPGMA. Ponto de corte, tendo por base a média das distâncias genéticas

Ao estabelecer o ponto de corte no dendrograma, tendo por base a média das distâncias genéticas, é possível observar a formação de quatro grupos, identificados a seguir: grupo I que pode ser considerado um grupo isolado em relação aos demais, é formado pelo acesso BGCA48, o mais divergente e que caracteriza-se principalmente por apresentar elevados valores de ECA e PCA; o grupo II formado pela maioria dos acessos, foi também o que apresentou o par de acessos mais similar: BGCA24 com BGC25; o grupo III é formado por somente um acesso, que caracteriza-se por apresentar elevados valores das variáveis relacionadas a pedúnculo; o grupo IV é formado por acessos que apresentam pedúnculos de baixa acidez e alto teor de doçura.

O padrão de agrupamento estabelecido pelo método UPGMA apresentou concordância com a projeção *Biplot*, sendo a discriminação dos grupos explicada pela dispersão dos acessos no gráfico. A interpretação destas análises demonstraram elevada diversidade genética apresentada pelos acessos em estudo.

### 3.4 DISCUSSÃO

Caracteres físicos e químicos são de extrema importância nas ações de manejo, pós-colheita e aceitação dos frutos e seus derivados pelo mercado consumidor (CHITARRA, 2001). Deste modo, a caracterização dos acessos de bancos de germoplasma a partir de caracteres morfológicos e químicos de interesse agrônômico torna-se indispensável.

Ao estabelecer uma comparação com indivíduos provenientes de populações nativas de cajuí da vegetação litorânea piauiense (RUFINO, 2004), pôde-se observar que os acessos apresentaram grande variabilidade para caracteres relacionados ao pedúnculo e castanha, indicando que o BAG da Embrapa Meio-Norte apresenta grande representatividade da diversidade genética de cajuís do litoral do Piauí.

Em relação aos caracteres químicos, os acessos apresentam elevado potencial de aproveitamento. De acordo com a classificação de HOFFMANN (2001), os acessos de cajuí são, em sua maioria, muito ácidos com exceção dos acessos BGCA22, BGCA26, que são classificados como ácidos, e o BGCA48, como pouco ácido.

Tendo por base os padrões de referência estabelecidos pelo MAPA, para o processamento da polpa de caju, para a ATT mínima e pH máximo (BRASIL, 2000), quase todos os acessos atendem a estes padrões, as exceções foram: BGCA22, BGCA26 e BGCA48. Em relação ao valor mínimo de SST medidos em °Brix (BRASIL, 2000), todos os acessos se enquadram nos critérios estabelecidos. Dentre os acessos com melhor potencial de aproveitamento destacam-se: BGCA48; BGCA22; BGCA26; BGCA27 e BGCA36, com valores de SST/ATT iguais a 80,50; 74,00; 66,67; 37,50; e 34,00, respectivamente.

É importante ressaltar que alguns acessos mesmo apresentando baixos valores da relação SST/ATT podem ser aproveitados, pois frutos com alta acidez são bastante apreciados, especialmente em questão a segurança alimentar.

Pode-se observar que houve uma ampla variação apresentada pelos descritores analisados, indicando uma elevada divergência entre os acessos, que foi avaliada por meio das análises multivariadas.

Na realização das análises discriminantes, os acessos foram alocados *a priori* em dois grupos distintos com base no local de coleta, sendo considerados neste estudo como duas populações diferentes, uma constituída pelos acessos coletados no município de Parnaíba e a outra pelos acessos procedentes de Ilha Grande.

A partir da ACP, pôde-se estabelecer quais variáveis mais contribuem para cada componente principal, sendo que as variáveis de maior peso no CP1 foram as relacionadas a castanha e pedúnculo; no CP2 aos atributos químicos e, no CP3 as relacionadas à inflorescência.

Ao estabelecer um paralelo entre a ACP e a contribuição relativa dos caracteres para divergência genética pelo método de Singh (1981), pode-se inferir que as variáveis CIN e LIN apresentam grande importância na diferenciação genética dos acessos analisados. Estudos da biologia floral de *Anacardium* são determinantes para a classificação das espécies do gênero (BARROS, 1988), podendo destacar o comprimento da inflorescência como um caráter importante na diferenciação das variedades estudadas (Sousa et al., 2007). Deste modo, pode-se apontar que as variáveis relacionadas à inflorescência são fundamentais na compreensão da diversidade de *Anacardium*.

Os dados gerados por este trabalho, também demonstram existir ampla diversidade genética dos acessos analisados, como pode ser constatada ao observar as análises de agrupamento. Estes resultados são confirmados pela análise do gráfico *Biplot*, que demonstra grande dispersão dos acessos dentro e entre os grupos, mesmo para a população de Ilha Grande, que é constituída apenas por cinco representantes, com muitos acessos encontrando-se mais próximos dos representantes do outro grupo do que dos acessos provenientes da sua região geográfica.

Este comportamento foi bastante nítido quando se observou o acesso BGCA25, coletado no município de Parnaíba, entretanto, o mesmo está mais próximo dos indivíduos procedentes de Ilha Grande.

Por esta razão um aspecto importante a ser considerado é a associação entre a dispersão dos acessos analisada pelo gráfico *Biplot* e os métodos de agrupamento. A partir destas análises, observa-se a formação de um grande grupo, composto pela maioria dos acessos e com representantes dos dois

municípios de coleta. No entanto, alguns acessos projetaram-se para fora deste grupo principal. Admite-se, então, que os acessos são agrupados por compartilharem características morfológicas comuns. Entretanto, algumas variáveis apresentam maior peso na discriminação de determinados acessos em particular, propiciando a estes apresentarem características fenotípicas próprias, sendo então mais divergentes em relação aos demais.

O acesso BGCA28, pelo método de *Tocher*, formou um grupo homogêneo com os acessos BGCA24 e BGCA25. No entanto, uma análise mais detalhada pelo método UPGMA permite determinar que os acessos BGCA24 e BGCA25 formam um subgrupo mais próximo entre si quando comparados ao acesso BGCA28. O que pode ser explicado pelo gráfico *Biplot*, já que o acesso BGCA28 assemelha-se a estes com relação às características químicas. No entanto, as variáveis relacionadas a pedúnculo possibilitam uma maior diferenciação do acesso BGCA28.

Um possível cenário na explicação destes dados pode ser a ação humana a partir da introdução de cajuís de diferentes localidades, uma vez que grande parte dos acessos foi coletada em propriedades rurais.

O acesso BGCA29 apresenta a maior distância Euclidiana média com o acesso BGCA48, entretanto ambos foram coletados no mesmo local, Fazenda Bom Jesus, município de Parnaíba, a análise do gráfico de dispersão *Biplot* confirma esta distância entre os acessos. Tendo por base as variáveis mais importantes na explicação dos resultados apresentados pelo acesso BGCA48, pode ter ocorrido seleção para caracteres de importância econômica, em especial a produção de castanha e aproveitamento do pedúnculo.

As variações fenotípicas em caju podem ser resultantes das diferentes origens geográficas, adaptação ao ambiente local e seleção humana, com este último tendo forte influência na dispersão do fruto (CHIPOJOLA et al., 2009). Em alguns casos a maior variabilidade apresentada pode estar mais associada à manipulação pelo homem do que em função da localização geográfica (BARROS, 1991).

Alguns outros fatores, e possivelmente a associação entre eles, também podem ser apontados para explicar a organização da diversidade genética entre os acessos de cajuí. O pedúnculo carnoso e succulento é bastante atrativo para pequenos animais que podem dispersar este pseudofruto, juntamente

com o fruto, a longas distâncias, com principal agente dispersor morcegos frugívoros (MITCHELL; MORI, 1987); os principais agentes dispersores do pólen são as abelhas (FREITAS; PAXTON, 1998), permitindo deste modo, a intensa dispersão de pólen e fruto entre as populações de Parnaíba e Ilha Grande.

O acesso BGCA48 apresenta características intermediárias entre o cajuí e o caju comum, sendo caracterizado pela população como um grupo distinto, denominado cajuá (EMBRAPA MEIO-NORTE, 2002), além disto, sobreposições em medidas foliar demonstram que cajuí e caju da vegetação litorânea piauiense são bastante semelhantes em relação à morfometria foliar (VIEIRA; MAYO; ANDARDE, 2014), uma hipótese que surge em função destas observações seria a possibilidade que este acesso seja um híbrido entre cajuí e *A. occidentale*. Os indícios de fracas barreiras reprodutivas entre as espécies do gênero (MITCHELL; MORI, 1987), reforçam esta hipótese.

O estabelecimento de bancos de germoplasma é uma das estratégias na conservação de recursos genéticos, o emprego de técnicas multivariadas é imprescindível na manutenção, gerenciamento e discriminação da diversidade genética presente nestes bancos. Os métodos de agrupamento são de extrema importância na determinação de grupo de acessos similares e divergentes nos bancos de germoplasma, em combinação com análises que discriminam essa diversidade com base em variáveis de interesse econômico, como gráfico de dispersão gerados a partir de ACP, é possível selecionar acessos para potenciais cruzamentos.

O acesso BGCA48 apresenta a maior dispersão gráfica em relação a todos os acessos, sendo as variáveis relacionadas ao tamanho do fruto (castanha + pedúnculo), principalmente a ECA e PCA, as que mais contribuem para esta diferenciação. Essa maior divergência é confirmada pelas análises de agrupamento pelo método UPGMA e de otimização de *Tocher* por meio das quais o acesso BGCA48 formou um grupo isolado. Sendo também o que compôs as combinações mais divergentes para todos os pares de acesso comparados pela distância Euclidiana média. Indicando ser este acesso um excelente candidato como genitor em programas de melhoramento.

Embora o acesso BGCA48 apresente características favoráveis em relação à seleção para castanha e pedúnculo e elevado valor da relação

SST/ATT, bastante apreciado tanto pela industrial como para o consumo *in natura*, os valores para pH e ATT não estão dentro dos padrões indicados pelo MAPA. Deste modo, combinações podem ser estabelecidas, no intuito de se obter um material que seja considerado de qualidade superior, como no cruzamento com o genótipo BGCA36, agregando características de interesse em relação à qualidade do pedúnculo, em termos de acidez e doçura, e tamanho do fruto (castanha + pedúnculo).

Outras indicações de possíveis cruzamentos também podem ser estabelecidas em termos de qualidade do pedúnculo, como no cruzamento do acesso BGCA28 em combinação com o acesso BGCA27.

As análises realizadas quantificaram e discriminaram a dimensão da diversidade genética dos acessos de cajuí. De modo geral, os acessos analisados apresentam grande variabilidade genética e um elevado potencial para aproveitamento comercial. Alguns acessos exibem características favoráveis tanto ao aproveitamento *in natura*, que é de extrema importância, tendo em vista o valor desta planta para as comunidades locais, como para o processamento de seus derivados pela indústria. Cajuís que não apresentam qualidades adequadas ao mercado de mesa, possuem qualidades que permitem o seu aproveitamento pela indústria processadora. A caracterização do BAG do cajuí da Embrapa Meio Norte e a informação de grupos e subgrupos de acessos podem ser usados em futuros programas de melhoramento com excelentes candidatos para combinação de cruzamentos ou mesmo na obtenção de híbridos interespecíficos com outras espécies do gênero, a exemplo dos cruzamentos entre *A. occidentale* x *A. microcarpum* (CRISÓSTOMO et al., 2002).

### 3.5 CONCLUSÕES

Os acessos do BAG do Cajuí da Embrapa Meio-Norte apresentam elevada diversidade genética tanto para caracteres morfológicos quanto para as variáveis químicas, exibindo potencial para o mercado de mesa, processamento de seus derivados e alguns para duplo aproveitamento.

A elevada divergência genética e o modo como esta se organiza é provavelmente resultado da atuação de alguns fatores, como a grande diversidade de agentes dispersores, possíveis híbridos interespecíficos e em decorrência da ação humana.

O acesso BGCA48 apresenta-se como um provável intermediário entre caju e cajuí, sendo o mais divergente em combinação com todos os demais acessos.

Algumas combinações de cruzamentos podem ser indicadas com o objetivo de se obter indivíduos superiores em termos de qualidade de pedúnculo, tanto para o aproveitamento *in natura*, quanto pela indústria. Entre os mais promissores, destacam-se as combinações entre os acessos BGCA48 com BGCA36, e BGCA28 com BGCA27.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.S. **Qualidade, compostos bioativos e atividade antioxidante total de pendúculos de cajuzeiros e frutos de umbuzeiros nativos do semi – árido do Piauí.** 2009. 186f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Semi – Árido, Mossoró, 2009.

BARROS, L. M. **Caracterização morfológica e isoenzimática do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) tipos comum e anão-precoce, por meio de técnicas multivariadas.** 1991. 256 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz- ESALQ, Piracicaba, 1991.

BARROS, L.M. Biologia floral, colheita e rendimento. In: LIMA, V.P.M.S. **A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil.** Fortaleza: BNB/ETENE, p.301-319, 1988.

BRASIL. Instrução Normativa nº 01, de 07 de janeiro de 2000. Anexo I. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan. 2000. Seção 1. p.54.

CARBAJAL, A. C. R.; SILVA JÚNIOR, N. Sebrae-CE/Embrapa, Fortaleza. **Castanha de caju: recomendações práticas para a melhoria da qualidade.** Agroindústria Tropical, 2003,16p.

CHIPOJOLA, F. M.; MWASE, W. F.; KWAPATA, M. B.; BOKOSI, J. M.; NJOLOMA, J. P.; MALIRO, M. F. Morphological characterization of cashew (*Anacardium occidentale* L.) in four populations in Malawi. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 5173-5181, 2009.

CHITARRA, A. B.. **Tecnologia de Pós-Colheita para Frutas Tropicais.** 1. ed. Fortaleza: Instituto De Desenvolvimento da Fruticultura e Agroindústria-SINDIFRUTA, v. 150, 2001, 314p .

CRESPO, M.F. V.; SOUZA, L. I de. **Cajuí: boas práticas e manejo sustentável.** Parnaíba: Sieart, 2014.

CRUZ C. D. **Programa genes:** aplicativo computacional em genética e estatística. 2013. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm>>. Acessado em: 20/Mar/2015.

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

EMBRAPA MEIO-NORTE. **Cajuí: Potencial para a agroindústria familiar.** Teresina, ano 4, n.12, Out./Nov./Dez., 2002. Encarte técnico, p. 5.

- FIGUEIREDO FILHO, D. B.; SILVA JÚNIOR, J. A. da. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, v. 18, n. 1, 2009.
- FREITAS, B.M.; PAXTON, R.J. A comparison of two pollinators: the introduced honey bee *Apis mellifera* and an indigenous bee *Centris tarsata* on cashew *Anacardium occidentale* in its native range of NE Brazil. **Journal of Applied Ecology**, v.35, p.109-121, 1998.
- GOMES, J. C. M. et al. Caracterização pós-colheita de clones de cajueiro anão precoce no oeste da Bahia. **Revista Bahia Agrícola**, v. 07, p. 76-80, 2009.
- HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p.9, 2001.
- HOFFMANN, F. L. Higiene: Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. **Brasil Alimentos**, São Paulo, Signus Editora Ltda, n. 9 ,v.1 – Jul./Ago. 2001.p. 23-30.
- IBPGR. **Cashew descriptors**. International Board for Plant Genetic Resources. Rome, 1986.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ (Brasil). Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4ª ed.São Paulo, 2005.
- MELO FILHO, H. F. R.; MEDEIROS, L. A. R.; JACOMINE, P. K. T. Embrapa-SNLCS.**Levantamento detalhado dos solos da área da UEPAE de Teresina, PI**. Rio de Janeiro,1980, p.154.
- MELO, F. de B.; CAVALCANTI, A. C.; ANDRADE JÚNIOR, A. S. de; BASTOS, E. A. Embrapa Meio-Norte. **Levantamento detalhado dos solos da área da Embrapa Meio-Norte/UEP de Parnaíba**. Teresina,2004, p.25.
- MITCHELL, J.O.; MORI, S.A. The cashew and its relatives (*Anacardium occidentale* L.). **Memoirs of the New York Botanical Garden**, v. 42, n.1, p. 1-76, 1987.
- PESSONI, L. A.; CRUZ, C. D. Repetibilidade de variáveis morfológicas utilizadas na caracterização da diversidade genética de populações de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). In: 3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2005, Gramado. Embrapa - Trigo **Anais do 3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. Passo Fundo, v.1, 2005.
- PUTH, M. -T.; NEUHÄUSER, M.; RUXTON, G. D.. Effective use of Pearson's product moment correlation coefficient. **Animal Behaviour**, v. 93, p.183-189, 2014.

RUFINO, M.S.M. **Qualidade e potencial de utilização de cajuís (*Anacardium* spp.) oriundos da vegetação litorânea do Piauí**. 2004. 92 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2004.

RUFINO, M.S.M.; CORRÊA, M.P.F.; ALVES, R.E.; LEITE, L.A.S. Utilização atual do cajuí nativo da vegetação litorânea do Piauí, Brasil. **Proceedings of the Tropical Region - American Society for Horticultural Science**, v.52, 147-149, 2008.

SAS INSTITUTE. **SAS language and procedures**: usage. Version 9.0. Cary, 2002.1CD-ROM.

SINGH D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v.41, p. 237–245, 1981.

SOUSA, L. B; et al. Aspectos de biologia floral de cajueiros anão precoce e comum. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p.882-885, 2007.

VIEIRA, M.; MAYO, S. J.; ANDRADE, I. M. Geometric morphometrics of leaves of *Anacardium microcarpum* Ducke and *A. occidentale* L. (Anacardiaceae) from the coastal region of Piauí, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, [s.v.;s.p.], 2014.

#### 4 Diversidade genética em cajuí (*anacardium* spp.) por meio de marcadores moleculares ISSR

##### RESUMO

O cajuzeiro é uma planta nativa da vegetação litorânea piauiense e caracteriza-se por apresentar fruto e pseudofruto pequenos. Nesta região, o cajuí possui grande importância como fonte alimentícia e na geração de renda. Considerando a falta de informações genéticas moleculares e de estudos da estrutura populacional de cajuís provenientes desta região, este trabalho teve por objetivo, avaliar a diversidade e estrutura populacional de 25 acessos de cajuí pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma do Cajuí da Embrapa Meio-Norte, distribuídos em duas populações, tendo por base o local de coleta. Para tanto, foram usados nove *primers* ISSR, que amplificaram um total de 104 locos, apresentando 91,3% de polimorfismo. Os acessos possuem elevada diversidade genética, demonstrada pelos altos valores dos índices de diversidade. Os agrupamentos obtidos pelo método UPGMA, demonstraram uma mistura entre os indivíduos de diferentes populações. A análise de variância molecular (AMOVA) indicou que toda a variabilidade genética existente encontra-se dentro das populações. O baixo valor de  $G_{st}$  (0,0366) e elevado valor de  $N_m$  (13,145), sustentam os resultados da AMOVA, indicando pouca diferenciação genética entre as populações, com a diversidade genética podendo ser compreendida como resultado do elevado fluxo gênico. As análises realizadas no programa Structure, por meio da abordagem bayesiana, corroboram com os demais resultados, comprovando que existe uma mistura entre os acessos e que as populações definidas *a priori*, não constituem os verdadeiros grupos biológicos. No entanto, o valor do K mais provável, demonstra que a distribuição da diversidade genética dos acessos de cajuí está organizada em dois grupos distintos, indicando que outros fatores, como por exemplo, a seleção realizada pelo homem; e a possibilidade de indivíduos híbridos interespecíficos, podem estar atuando na diferenciação dos grupos biológicos.

**Palavras-chave:** banco de germoplasma, estrutura populacional, vegetação litorânea

## Genetic diversity in cashew (*Anacardium* spp.) by ISSR molecular markers

### ABSTRACT

The cashew tree is a native plant of the coastal vegetation of Piauí and is characterized by having small fruit and pseudofruit. In this region, the cashew has great importance as a food source and income generation. Considering the lack of molecular genetic information and studies of the population structure of cashews from the coastal region of Piauí, this study aimed to assess the diversity and population structure of 25 cashew accesses from the cashew Active Germplasm Bank of Embrapa Meio-Norte, which are divided into two populations based on their collection site. For that, it were used nine ISSR primers, which amplified a total of 104 loci, with 91.3% of polymorphism. The high levels of genetic diversity identified in the accesses were demonstrated by the high values of the diversity indices. In addition, the groups obtained by the UPGMA method showed a cross between individuals of different populations. The analysis of the molecular variance (AMOVA) indicated that all existing genetic variation is found within populations. The low value of  $G_{st}$  (0.0366) and high value  $N_m$  (13.145) support the results of AMOVA, indicate there is little genetic differentiation among the populations, and presume that the genetic diversity can be understood as a result of high gene flow. The analysis conducted in the Structure program, through the Bayesian approach, corroborate other results and prove that there is a mix of access, as well as that the populations, previously defined, are not the true biological groups. However, the most probable value of  $K$  shows that the distribution of the cashew genetic diversity accesses are organized into two distinct groups, which indicates that other factors such as the selection made by man and the possibility of having interspecific hybrid individuals may be acting in the differentiation of these biological groups.

**Keywords:** germplasm bank, population structure, coastal vegetation

#### 4.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Anacardium* compreende cerca de dez espécies, todas ocorrentes em território brasileiro, sendo este o principal centro de diversidade (MICHELL; MORRI, 1987). Algumas espécies recebem uma terminologia específica baseada na morfologia do fruto e pseudofruto, sendo classificadas como cajuí as plantas do gênero *Anacardium* cujo peso da castanha não ultrapassa 3,33 g (CARBAJAL; SILVA JÚNIOR, 2003).

O cajuzeiro é uma planta nativa bastante apreciada pelas comunidades rurais do litoral piauiense, sendo uma das principais fontes de renda, alimento e de fundamental importância ambiental. A planta é característica da vegetação litorânea e umas das principais fixadoras de dunas. O pedúnculo e a amêndoa, obtida a partir da castanha, fazem parte da culinária local. O pedúnculo nutritivo e suculento pode ser consumido *in natura* ou processado na forma de doces, sucos, bebidas, temperos, além de poder ser usado na complementação alimentar, principalmente como fonte de minerais (cálcio, ferro e fósforo) e vitamina C. A castanha é usada na alimentação ou comercializada em feiras e mercados locais. (CRESPO; SOUZA, 2014; RUFINO, 2004; RUFINO et al., 2008).

Todo o produto proveniente do cajuzeiro é fruto do extrativismo, que muitas vezes é realizado de forma inconsequente pelas comunidades locais. Apesar de esforços na conscientização das populações locais e incentivos ao agroextrativismo a perda da variabilidade genética decorrente das ações humanas representa um risco considerável.

Deste modo, a conservação da variabilidade genética de cajuí procedentes da vegetação litorânea piauiense é muito importante, e pode ser realizada por meio da conservação *ex situ* em bancos de germoplasma. No entanto, para que as ações de manejo de germoplasma em espécies frutíferas sejam eficientes é necessária a caracterização, quantificação e discriminação da variabilidade genética presente, bem como o estabelecimento das relações inter e intrapopulacionais.

A detecção de variabilidade genética diretamente do DNA, permitida pelo uso de marcadores moleculares tem possibilitado muitos avanços na pesquisa científica, especialmente em estudos de diversidade genética. Entre os marcadores moleculares baseados em PCR, destaca-se o ISSR por

apresentar elevada porcentagem de polimorfismo, baixo custo e eficiente diferenciação entre indivíduos não tão próximos (GUPTA et al., 1994; BORNET; BRANCHARD, 2001; REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002).

A avaliação da diversidade genética de cajuí provenientes do estado do Piauí tem sido realizada com base apenas em dados morfológicos e físico-químicos, trabalhos com marcadores moleculares ainda não tinham sido realizados até o presente estudo.

Deste modo, o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização molecular e estabelecer as relações genéticas entre 25 acessos de cajuí do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Meio Norte.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Material Vegetal

Este estudo foi realizado a partir de 25 acessos de cajuí mantidos pelo Banco Ativo de Germoplama do Cajuí da Embrapa Meio-Norte, coletados nos municípios de Ilha Grande e Parnaíba, estado do Piauí. Os acessos estão implantados em dois campos experimentais: no campo experimental na sede da Embrapa Meio-Norte, localizado no município de Teresina-PI; e o segundo, no campo experimental da Embrapa Meio-Norte/UEP no município de Parnaíba-PI.

Tendo por base a localização geográfica os acessos foram *a priori* divididos em duas populações. População I compreendendo todos os acessos coletados no município de Ilha Grande, e População II os acessos do município de Parnaíba. Neste estudo, as duas populações acima pré-definidas serão empregadas nas análises e posterior discussão dos índices de diversidade genética, estrutura e diferenciação genética populacional.

Todos os acessos do BAG do Cajuí analisados neste estudo foram propagados vegetativamente via enxertia. Portanto, apresentam a mesma constituição genética das plantas dos quais foram coletadas, possibilitando realizar inferências sobre estrutura e diferenciação das populações em sua localização geográfica.

Também foram usados no presente estudo, seis acessos cedidos pela Embrapa Agroindústria Tropical, pertencentes ao BAG do Caju, localizado no município de Pacajús, estado do Ceará; e um acesso coletado no município de Luzilândia, estado do Piauí, pertencente ao BAG do Cajuí da Embrapa Meio-Norte. Os sete acessos acima descritos, foram adicionados, exclusivamente, nas análises preliminares (estimativas de similaridade genética e porcentagem de polimorfismo) e de agrupamento pelo método UPGMA, para fins comparativos.

Informações referentes a cada acesso são fornecidas na Tabela 6.

### 4.2.2 Extração do DNA

O DNA foi coletado de folhas jovens, durante a fase ativa de crescimento das plantas. O material após ter sido coletado foi identificado, envolto em papel toalha, colocado em sacos plásticos vedados e acondicionado em isopor com

gelo em gel e transportados ao laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Meio Norte no município de Teresina. As amostras provenientes do BAG de Teresina foram imediatamente submetidas à extração logo após a coleta. As amostras provenientes do BAG de Parnaíba e Pacajus foram transportadas em gelo em gel do local de coleta ao Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Meio Norte e mantidas em freezer à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  até a etapa de extração do DNA. A extração do DNA genômico de todos os acessos em estudo foi realizada com o kit DNeasy Plant (QIAGEN,2006) seguindo recomendações do fabricante.

Tabela 6 – Lista dos acessos de *Anacardium* pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma do Cajuí da Embrapa Meio Norte e ao Banco Ativo de Germoplasma do Caju pertencente a Embrapa Agroindústria Tropical, Pacajus-CE; usados na análise de diversidade genética baseada em marcadores moleculares ISSR.

GENÓTIPO	ESPÉCIE	LOCAL DE COLETA	MUNICÍPIO	INSTITUIÇÃO
BGCA 22	<i>Anacardium</i> sp.	Povoado Labino	Ilha Grande	Embrapa Meio-Norte/UEP
BGCA 23	<i>Anacardium</i> sp.	Povoado Baixão	Ilha Grande	Embrapa Meio-Norte/UEP
BGCA 24	<i>Anacardium</i> sp.	Povoado Cal	Ilha Grande	Embrapa Meio-Norte/UEP
BGCA 25	<i>Anacardium</i> sp.	Pedra do Sal	Parnaíba	Embrapa Meio-Norte/UEP
BGCA 26	<i>Anacardium</i> sp.	Pedra do Sal	Parnaíba	Embrapa Meio-Norte/UEP
BGCA 27	<i>Anacardium</i> sp.	Pedra do Sal	Parnaíba	Embrapa Meio-Norte/UEP
BGCA 28	<i>Anacardium</i> sp.	Fazenda Bom Jesus	Parnaíba	Embrapa Meio-Norte/UEP
BGCA 29	<i>Anacardium</i> sp.	Fazenda Bom Jesus	Parnaíba	Embrapa Meio-Norte/UEP
BGCA 30	<i>Anacardium</i> sp.	Povoado Labino	Ilha grande	Embrapa Meio-Norte/UEP
BGCA 31	<i>Anacardium</i> sp.	Embrapa/UEP	Parnaíba	Embrapa Meio-Norte/UEP
BGCA 32	<i>Anacardium</i> sp.	Embrapa/UEP	Parnaíba	Embrapa Meio-Norte/UEP
BGCA 33	<i>Anacardium</i> sp.	Fazenda Bom Jesus	Parnaíba	Embrapa Meio-Norte/UEP
BGCA 34	<i>Anacardium</i> sp.	Pedra do Sal	Parnaíba	Embrapa Meio-Norte/UEP
BGCA 35	<i>Anacardium</i> sp.	Fazenda Bom Jesus	Parnaíba	Embrapa Meio-Norte/UEP
BGCA 36	<i>Anacardium</i> sp.	Embrapa/UEP	Parnaíba	Embrapa Meio-Norte/UEP
BGCA 37	<i>Anacardium</i> sp.	Embrapa/UEP	Parnaíba	Embrapa Meio-Norte/UEP
BGCA 39	<i>Anacardium</i> sp.	Povoado Labino	Ilha Grande	Embrapa Meio-Norte
BGCA 40	<i>Anacardium</i> sp.	Pedra do Sal	Parnaíba	Embrapa Meio-Norte
BGCA 41	<i>Anacardium</i> sp.	Pedra do Sal	Parnaíba	Embrapa Meio-Norte
BGCA 42	<i>Anacardium</i> sp.	Fazenda Bom Jesus	Parnaíba	Embrapa Meio-Norte
BGCA 43	<i>Anacardium</i> sp.	Povoado Labino	Ilha Grande	Embrapa Meio-Norte
BGCA 44	<i>Anacardium</i> sp.	Povoado Labino	Ilha Grande	Embrapa Meio-Norte
BGCA 45	<i>Anacardium</i> sp.	Povoado Labino	Ilha Grande	Embrapa Meio-Norte
BGCA 48	<i>Anacardium</i> sp.	Fazenda Bom Jesus	Parnaíba	Embrapa Meio-Norte
BGCA 49	<i>Anacardium</i> sp.	Fazenda Bom Jesus	Parnaíba	Embrapa Meio-Norte
BGCA 46*	<i>Anacardium</i> sp.	Luzilândia	Luzilândia	Embrapa Meio-Norte
<i>A. humile</i> *	<i>A. humile</i>			Embrapa Agroindústria Tropical
<i>A. microcarpum</i> *	<i>A. microcarpum</i>			Embrapa Agroindústria Tropical
<i>A. othonianum</i> *	<i>A. othonianum</i>			Embrapa Agroindústria Tropical
CCP-06*	<i>A. occidentale</i>			Embrapa Agroindústria Tropical
CCP-76*	<i>A. occidentale</i>			Embrapa Agroindústria Tropical
<i>A. giganteum</i> *	<i>A. giganteum</i>			Embrapa Agroindústria Tropical

\* : acessos adicionadas às análises das estimativas de similaridade genética, porcentagem de polimorfismo, e de agrupamento pelo método UPGMA

#### 4.2.3 Quantificação e qualidade do DNA

A quantificação do DNA genômico foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a uma concentração de 0,8%, a reação foi preparada com tampão TBE 0,5x (Tris-Borato-EDTA) e corado com GelRed-Biotium® a 1x, DNA- $\lambda$  diluído na concentração de 100 ng/ $\mu$ L foi usado para fins comparativos.

As amostras de DNA também foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop®-2000, sendo a concentração calculada em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O DNA foi diluído para solução de trabalho, em concentração de 7ng/ $\mu$ L.

#### 4.2.4 Seleção de *primers* e reação em cadeia da polimerase (PCR)

Testes preliminares de amplificação foram realizados com 32 *primers* de 15-18 nucleotídeos de comprimento desenvolvidos pela *University of British Columbia* (UBC), Vancouver, Canadá. Destes, nove foram selecionados com base no melhor padrão de amplificação em relação ao polimorfismo, qualidade e resolução das bandas. Em seguida, esses *primers* foram submetidos a testes para determinação da melhor temperatura de anelamento (Tabela 7). Adicionalmente foram realizados testes para demonstrar a reprodutibilidade dos marcadores ISSR. Para tanto, foram realizadas amplificações com o *primer* UBC 808 usando dois termocicladores diferentes e com o *primer* UBC 886 usando Taq DNA polimerase de duas marcas diferentes.

Múltiplas condições de amplificação foram testadas, entre elas: diversas concentrações de DNA genômico e *primers*. Também foram testadas diferentes concentrações de reagentes, bem como diferentes ciclos de amplificação. As concentrações usadas na reação final de 10  $\mu$ L foram de: tampão 1,0x [20 mM Tris HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 50% (v/v) glicerol],  $\text{MgCl}_2$  a 2,0 mM, 0,8 mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,8  $\mu$ M do *primer*, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1  $\mu$ L de DNA genômico (7 ng/ $\mu$ L).

As reações de amplificação envolvendo repetidos ciclos de desnaturação, anelamento e extensão foram realizadas em termociclador (ependorf) com capacidade para 96 amostras adotando os seguintes parâmetros: uma desnaturação inicial a 94°C por 1,5 minutos; seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento à temperatura dependente do *primer* (Tabela 7) por 45 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos; uma etapa de extensão final a 72°C por 7 minutos.

Tabela 7 - Características dos *primers* de marcadores ISSR avaliados na amplificação de DNA genômico de germoplasma de cajuí (*Anacardium ssp.*)

Primers UBC	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>a</sub> (testadas) CAJUÍ	T <sub>a</sub> (otimiz)	Sequência 5'_____3'	G + C (%)
808	48,8	49; 50; 51; 54	54° C	AGA GAG AGA GAG AGA GC	52,94
825	51,4	50; 52; 54; 56	56° C	ACA CAC ACA CAC ACA	46,67
836	48,9	50; 52; 54; 56	52° C	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	50,00
841	48,5	50; 51; 52	51° C	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	55,55
845	48,1	48; 50; 51	50° C	CTC TCT CTC TCT CTC TRG	55,55
855	53,1	50; 54; 56; 58	56° C	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	50,00
856	52,8	54; 55; 57	55° C	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	50,00
886	48,4	49; 50; 51; 52	52° C	VDV CTC TCT CTC TCT CT	58,82
889	50,1	50; 51; 52	52° C	DBD ACA CAC ACA CAC AC	58,82

T<sub>a</sub> = Temperatura de anelamento

Y=C/T; R=A/G; B=C/G/T; D=A/G/T; H=A/C/T; V=A/C/G; N=A/G/C/T

#### 4.2.5 Resoluções e visualizações dos fragmentos amplificados

Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese horizontal, usando gel de agarose a 1,5% em tampão de corrida TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5X, em voltagem constante de 110 V por 240 minutos, e corados com GelRed-Biotium® a 1x. Em todos os géis foram aplicados dois marcadores de peso molecular conhecido para fins de comparação, na primeira canaleta de cada gel foi aplicado 5µL do marcador 1 Kb (Invitrogen) e na última canaleta foi aplicado 5ul do (Ladder) 50 pb (Invitrogen). Em seguida os géis foram visualizados em transluminador UV e fotodocumentados, através do recurso de captura de imagens para uma posterior análise dos dados.

#### 4.2.6 Análise dos dados

As bandas geradas pela amplificação do DNA genômico de cada acesso foram usadas como dados a serem interpretados neste estudo. As bandas, amplificadas pelo mesmo *primer* que ocuparam a mesma posição no gel foram

consideradas como sendo pertencentes ao mesmo locus gênico. Seguindo este mesmo princípio, bandas geradas pelo mesmo *primer*, mas que ocupam posições diferentes são consideradas pertencentes a diferentes locos gênicos.

Cada banda foi designada como uma única característica, sendo os fragmentos amplificados codificados em dados binários, onde “1” significa presença do marcador e “0” a ausência do marcador.

#### 4.2.6.1 Análises preliminares e descritivas

A matriz de dados binários foi usada na construção de uma matriz de similaridade por meio do coeficiente de similaridade de Dice-Sorensen, calculada pelo programa PAST v.1.34 (HAMMER et al., 2001), conforme descrito pela expressão I:

$$S_{SDij} = \frac{2a}{(2a + b + c)} \quad \text{I}$$

onde:

a: ocorrência de bandas nos indivíduos i e j;

b: ocorrência de banda no indivíduo i e ausência no j;

c: ausência de banda no indivíduo i e ocorrência no j.

A partir da matriz binária de dados foi calculada a porcentagem de polimorfismo de cada *primer*, obtida pela razão entre o número de bandas polimórficas e o número total de bandas, como exemplificado na expressão II.

$$P = \frac{n^{\circ} \text{ total de LP}^*}{n^{\circ} \text{ total de locos analisados}} \times 100 \quad \text{II}$$

\* : locos polimórficos

Neste estudo foram considerados locos polimórficos aquele cuja frequência do alelo mais comum é menor que 95% (COLE, 2003).

#### 4.2.6.2 Análise das relações genéticas

A partir da matriz de similaridade dos 32 acessos de *Anacardium* listados na Tabela 6 foi realizada uma análise de agrupamento hierárquica pelo método UPGMA para ilustrar a relação genética entre os acessos, esta análise foi realizada no programa PAST v.1,34 (HAMMER et al., 2001). Para avaliar a consistência entre a matriz de similaridade e o dendrograma gerado foi calculado o coeficiente de correlação cofenética ( $r$ ). Esse coeficiente avalia o grau de ajuste do agrupamento, onde valores de  $r$  menores que 0,8 (80%) indicam inadequação do método de agrupamento. A estabilidade dos agrupamentos foi realizada a partir da análise de *bootstrap*, com 1000 permutações.

#### 4.2.6.3 Análise de diversidade genética

Dos 32 acessos de *Anacardium* descritos na Tabela 6, 25 foram usados na análise dos estimadores de diversidade genética. Destes, oito coletados no município de Ilha Grande e 17 no município de Parnaíba.

Marcadores dominantes apresentam a desvantagem de não distinguirem os locos em heterozigose dos homozigotos dominantes. Portanto, as análises realizadas não envolvem o Equilíbrio de Hardy–Weinberg (HWE), para que problemas comuns a dados dominantes pudessem ser evitados (CULLEY; WOLFE 2001; LYNCH; MILLIGAN; 1994).

Os parâmetros de diversidade genética avaliados no programa POPGENE v, 1,31 (YEH; BOYLE 1999) foram: Taxa de polimorfismo e índice de Shannon ( $I$ ), este obtido pela expressão III.

$$I = - \sum p_i (\log_2 p_i) \quad \text{III}$$

onde:

$p_i$ : é a proporção de indivíduos que possuem a banda no mesmo locus  $\log_2 p_i$  é o logaritmo de  $p_i$  com base 2,

Índice de Shannon-Weaver ( $I$ ) (SHANNON e WEAVER 1949) é adequado na análise de diversidade de dados dominantes, visto que não assume a ocorrência do HWE.

Também foram analisadas a hererozigosidade média, a partir da abordagem bayesiana proposta por Zhivotovsky (1999), obtida com o programa AFLP-SURV v, 1,0 (VEKEMANS, 2002) e a diversidade genética de Nei ( $h$ ) considerando a expansão de Taylor (LYNCH; MILLIGAN, 1994) a partir do programa TFPGA (MILLER, 1997).

#### 4.2.6.4 Análise da estrutura e diferenciação genética

As estimativas de diferenciação genética por meio da distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações foram obtidas no programa *ARLEQUIM 3.1* através da Análise de Variância Molecular – AMOVA (EXCOFFIER et al, 2007). Para tanto, foram usadas as duas populações descritas na análise de diversidade, item 4.2.7.3, a partir das quais foi determinado o  $\Phi_{St}$  (estimador análogo ao  $F_{St}$  de WRIGT, 1965). A análise de variância molecular foi conduzida com dois níveis hierárquicos: entre indivíduos dentro de populações e entre populações.

Adicionalmente foram calculadas as estimativas de fluxo gênico fornecido pelo número de migrantes por geração ( $N_m$ ) e de  $G_{St}$ , estimador análogo ao  $F_{St}$  de WRIGHT (1978), usado em análises de diferenciação genética, Valores de  $G_{St}$  entre os intervalos de 0,00 a 0,05; 0,05 a 0,15; 0,15 a 0,25 e maior que 0,25 indicam pequena, moderada, alta e elevada diferenciação genética, respectivamente. Estas análises estatísticas foram realizadas pelo programa POPGENE v, 1,31 (YEH et al, 1999)

Para verificar a estrutura populacional da espécie em estudo sem hierarquização *a priori* foi usado o programa Structure 2.3.4 (PRITCHARD, STEPHENS; DONNELLY, 2000). Este software emprega o método bayesiano de agrupamento, juntamente com o algoritmo Cadeia de Markov-MonteCarlo (MCMC). Cinco corridas independentes com 500.000 simulações em MCMC e 20.000 gerações “*burn-in*” foram usados para cada valor de K, sendo usado o modelo com mistura (*admixture model*).

A determinação do K mais provável em relação aos propostos foi realizada por meio dos valores de  $\Delta K$ , proposto por Evanno et al. (2005), através do website Structure Harvester v. 0.6.9.

Em seguida, a opção USEPOPINFO do programa Structure (FALUSH; STEPHENS; PRITCHARD, 2007) foi utilizada para testar os possíveis

indivíduos migrantes entre locais de amostragem ao utilizar estatísticas bayesianas para avaliar se todos os indivíduos da amostra são imigrantes para suas supostas populações, ou tem antepassados imigrantes recentes. O item GENSBACK foi estabelecido para o valor = 3 e a função MIGRPRIOR para o valor = 0,05. Assim ao usar a informação da população prévia para os indivíduos, o programa testa se cada indivíduo tem um ancestral imigrante nas últimas três gerações (valor de G), garantindo uma probabilidade de 95% de que os indivíduos pertencem à população informada antes de haver mistura. Foram realizadas 500.000 simulações em MCMC e 20.000 gerações “burn-in”.

### 4.3 RESULTADOS

Nove *primers* selecionados foram empregados nas análises de diversidade, agrupamento e estrutura populacional. As características de cada *primer* de marcadores ISSR foram apresentadas no item 3.2.4 (Tabela 7) deste trabalho.

Um total de 104 bandas (locos) foram amplificadas, sendo 95 polimórficas, resultando em um percentual de polimorfismo de 91,3 %. Nos *primers* analisados, observou-se uma variação de 6 a 17 no número de bandas amplificadas, com uma média de 11,55 bandas por *primer*. Seis *primers* (825, 841, 845, 855, 856, 889) produziram todos os locos polimórficos (Tabela 8). Como exemplo, o perfil de amplificação obtido a partir do *primer* UBC 845 é apresentado na Figura 8.

A Figura 9 demonstra a reprodutibilidade dos *primers* UBC 808 e UBC 886.

Tabela 8 - Locos amplificados e quantidade de polimorfismo gerados por 9 *primers* de marcadores ISSR.

<i>Primers</i>	Sequência	Total de locos	Locos polimórficos	% de polimorfismo
808	(AG) <sub>8</sub> C	11	8	72,7
825	(AC) <sub>7</sub> A	7	7	100
836	(AG) <sub>8</sub> YA	17	14	82,3
841	(GA) <sub>8</sub> YC	15	15	100
845	(CT) <sub>8</sub> RG	11	11	100
855	(AC) <sub>8</sub> YT	12	12	100
856	(AC) <sub>8</sub> YA	14	14	100
886	VDV(CT) <sub>7</sub>	11	8	72,7
889	DBD(AC) <sub>7</sub>	6	6	100
Total		104	95	91,3

Y=C/T; R=A/G; B=C/G/T; D=A/G/T; V=A/C/G.

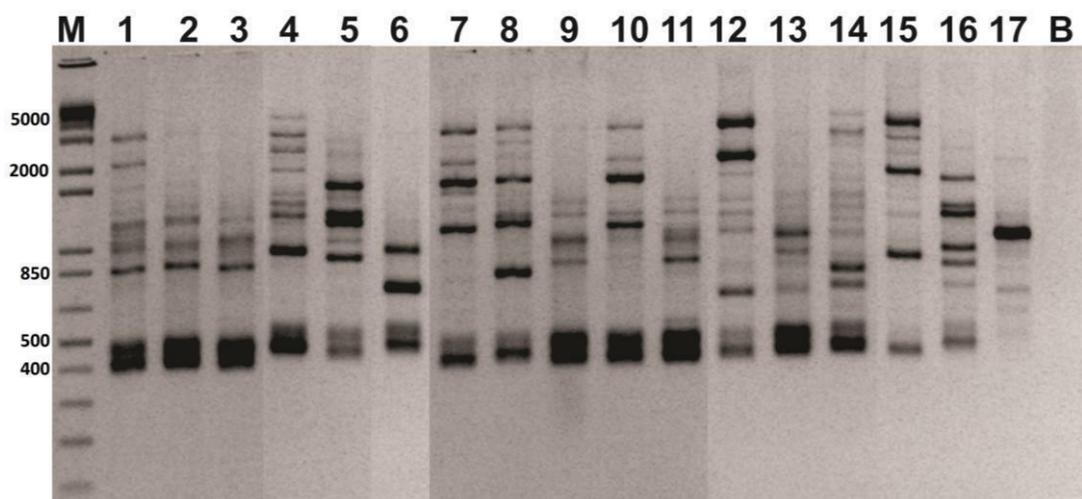


Figura 8 - Perfil de amplificação do *primer* UBC 845 em gel de agarose a 1,5% de 17 genótipos de *Anacardium*. M: marcador de peso molecular conhecido (1Kb plus, Invitrogen), 1-6: Acessos de Ilha Grande; 7-14: Acessos de Parnaíba, 15 – *Anacardium microcarpum*, 16 – CCP-76, 17 – *Anacardium humile*, B: controle negativo.

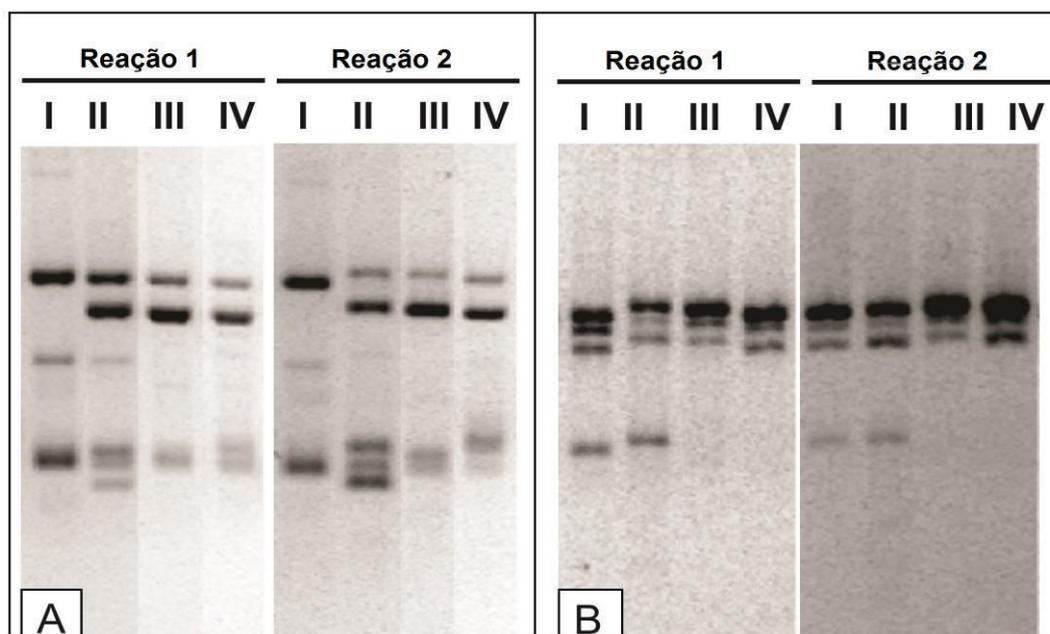


Figura 9 – Perfil de amplificação de diferentes reações usando o mesmo *primers* UBC 808 e UBC 886. **A:** *primer* 808: I – BGCA41; II – BGCA43; III – CCP76; IV – *A. microcarpum*. **B:** *primer* 886: I – BGCA23; II – BGCA24; III – BGCA25; IV – BGCA26.

#### 4.3.1 Diversidade genética

Ao analisarmos as populações isoladamente, observou-se que a população de Parnaíba apresentou maior polimorfismo (90,38%) em relação à população de Ilha Grande (72,12%), considerando todos os indivíduos conjuntamente, o polimorfismo foi de 93,27%. Este resultado é apoiado pelos estimadores de diversidade genética, pelos quais se pôde constatar que os índices de diversidade de Shannon ( $I$ ) e de Nei ( $h$ ) foram maiores na população de Parnaíba com valores de 0,416; 0,365 respectivamente comparados à população de Ilha Grande, cujos valores para estes índices foram de 0,371 e 0,289 (Tabela 9). Ao nível de todos os indivíduos, constatou-se que o valor do índice de diversidade de Shannon ( $I$ ) foi semelhante ao apresentado pela população de Parnaíba (0,416), portanto, mais alto que o exibido pela população de Ilha Grande (0,371). No entanto, o valor de heterozigidade média ( $H$ ) calculado a partir dos enfoques bayesianos foi similar para as duas populações, apresentando valor de 0,309 para a população de Parnaíba e 0,314 para a população de Ilha Grande.

Tabela 9 - Estimadores de diversidade genética de acessos de cajuí, usando 104 locos ISSR.

	Número de locos polimórficos	Porcentagem de locos polimórficos (%)	Índice de diversidade de Shannon ( $I$ )	Diversidade Genética de Nei ( $h$ )	Heterozigidade média ( $H$ )
Ilha Grande	75	72,12	0,371	0,289	0,314
Parnaíba	94	90,38	0,416	0,365	0,309
Todos os acessos	97	93,27	0,418		

#### 4.3.2 Análises das relações genéticas

Para fins comparativos, além dos 25 acessos coletados nos municípios de Parnaíba e Ilha Grande, pertencentes ao BAG do Cajuí de Embrapa Meio Norte, outros sete acessos foram incorporados à análise de agrupamento, um proveniente do município de Luzilândia-PI, e seis acessos fornecidos pela

Embrapa Agroindústria Tropical, pertencentes ao Banco de Germoplasma do Cajueiro, sendo dois clones comerciais de caju anão precoce e quatro espécies de *Anacardium* dispersas em território brasileiro.

A partir dos 104 locos amplificados pelos nove *primers* ISSR, foram estimadas as similaridades genéticas entre os 32 acessos de cajuí, calculadas por meio do coeficiente de similaridade de Dice-Sorensen, que variou de 0,2647 a 0,9176, com média de 0,5629. Com base na matriz de similaridade genética foi gerado um dendrograma empregando o método de agrupamento UPGMA (Figura 10). O coeficiente de correlação cofenética apresentou um valor elevado ( $r = 0,8591$ ), indicando um bom ajuste entre o dendrograma gerado e a matriz de similaridade original, o que permite realizar inferências pela análise visual.

De acordo com o dendrograma (Figura 10), observou-se a separação dos acessos em três grupos distintos, utilizando como ponto de corte a mudança brusca no padrão de agrupamento que pudesse ser sustentada por elevados valores de *bootstrap*.

Pôde-se perceber a formação de um grande grupo (grupo I), que reuniu mais de 96% dos acessos do BAG do cajuí junto com os clones CCP-06 e CCP-76, e as espécies *A. giganteum*, *A. othonianum*, *A. microcarpum*. Neste agrupamento, pode-se perceber que há uma mistura entre os indivíduos de diferentes locais de coleta. Observa-se também, que o acesso BGCA48 e a espécie *A. microcarpum* são os mais distintos dentro desse grupo, podendo constituir dois subgrupos distintos.

Os grupos II e III foram constituídos apenas por um acesso cada, indicando alta divergência destes. O grupo III foi o mais isolado em relação aos demais, indicando que o acesso BGCA36 é o mais diferenciado.

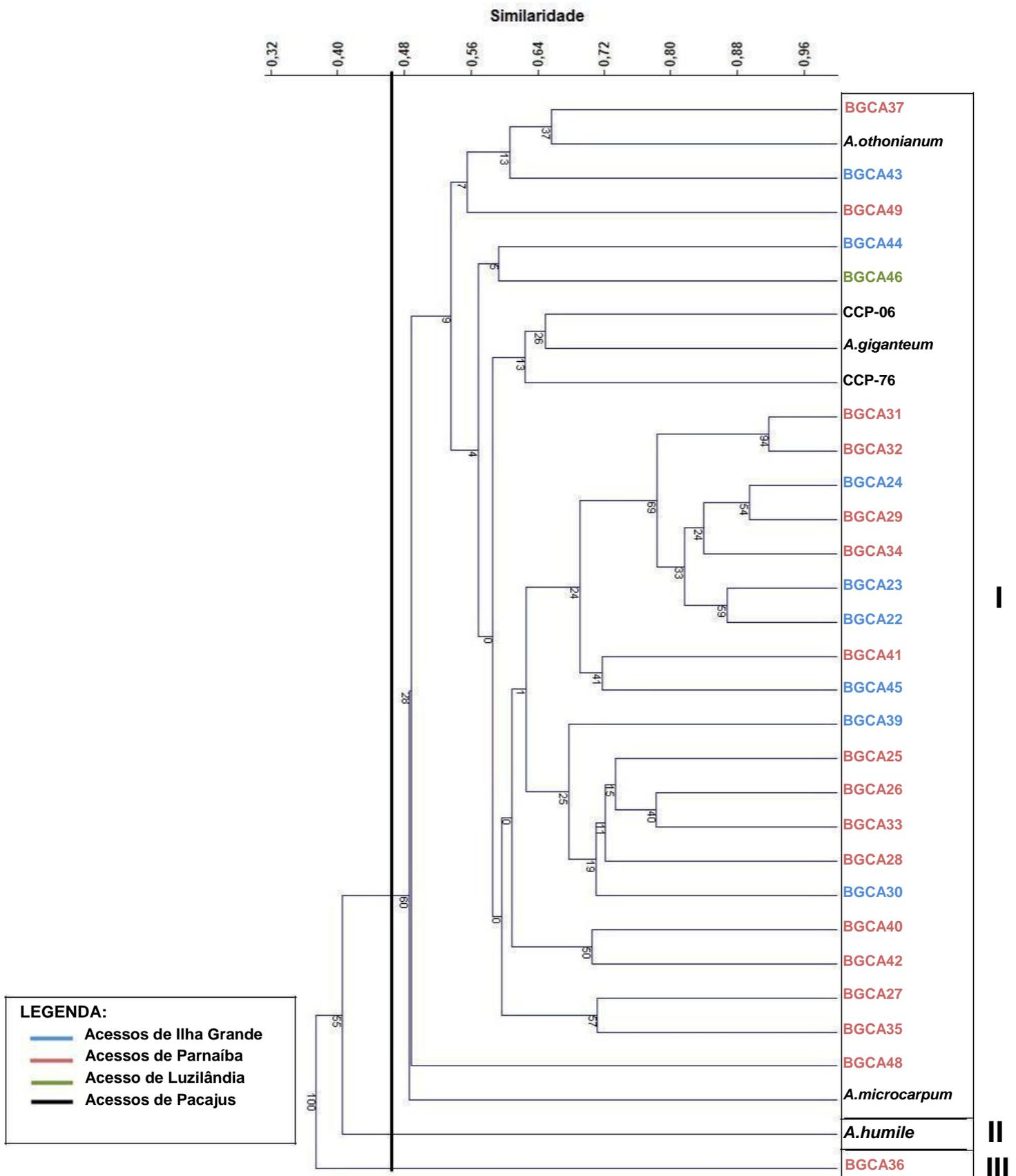


Figura 10 - Dendrograma (UPGMA) obtido a partir do coeficiente de similaridade de Dice-Sorensen de 32 acessos de *Anacardium* spp. provenientes dos municípios de Ilha Grande, Parnaíba e Luzilândia, estado do Piauí e município de Pacajús, estado do Ceará. Usando como ponto de corte a mudança brusca no padrão de agrupamento que pudesse ser sustentada por elevados valores de *bootstrap*.

### 4.3.3 Estrutura e diferenciação populacional

As análises de estrutura e diferenciação populacional foram realizadas com os 25 acessos coletados nos municípios de Parnaíba e Ilha Grande. Tendo por base o local de coleta, os acessos foram separados em duas populações.

A AMOVA revelou que 100% da variância foi encontrada dentro das populações (Tabela 10), ou seja, toda a variabilidade genética observada nos acessos de cajuí é devido as diferenças individuais entre os acessos de cada população e não há diferenciação genética entre as populações. O valor do índice de fixação ( $\Phi_{St}$ ) foi zero, sendo um indicativo de que não existe diferenciação genética nas populações definidas *a priori*. Esse resultado confirma o apresentado pela análise agrupamento UPGMA (Figura 11), onde os acessos não foram agrupados por localidades.

Tabela 10 – Análise de Variância Molecular (AMOVA) obtida para duas populações de cajuí do litoral piauiense, usando 104 locos de marcadores ISSR.

Fontes de Variação	GL	Componentes da Variância	Variação (%)	$\Phi_{St}$	P <sup>a</sup>
Entre populações	1	0,00000	0,00	0,00000	0,00000
Dentro de Populações	23	0,50000	100,00	-----	-----
Total	24	0,50000	100	-----	-----

<sup>a</sup> : Testes de significância após 1000 permutações; GL: grau de liberdade;  $\Phi_{St}$  : índice de fixação.

O valor de  $G_{St}$  (0,0366) indicou pouca diferenciação genética entre as populações de cajuí previamente definidas, sugerindo altas taxas de cruzamento, o que é apoiado pelo elevado valor de fluxo gênico, representado pelo número de migrantes por geração  $N_m$  (13,145).

As análises realizadas no programa Structure por meio da abordagem Bayesiana, que agrupa os indivíduos com base na constituição genética sem informação *a priori* de populações, sugeriram que os acessos estudados dividem-se em dois grupos geneticamente distintos, pois este foi o valor de  $\Delta K$  mais provável (Figura 11).

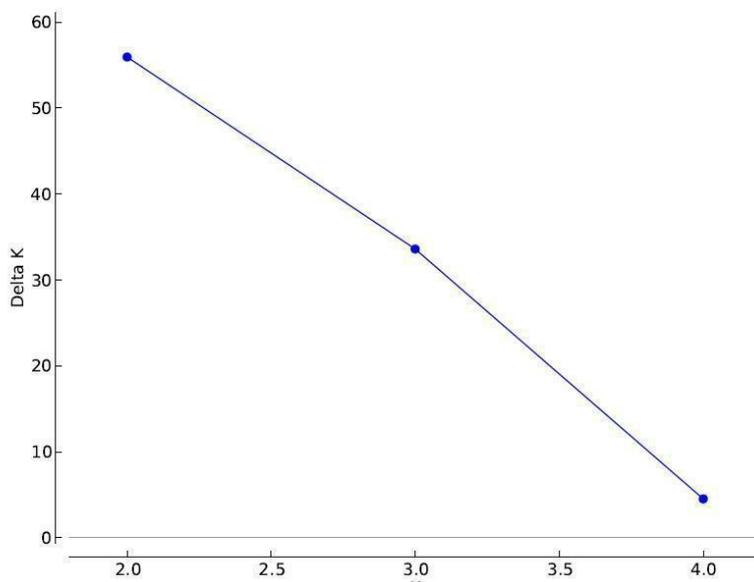


Figura 11 - Representação gráfica do  $\Delta K$  calculado de acordo com o proposto por Evanno et al. (2005). O maior valor de  $\Delta K$  corresponde ao K mais provável.

O teste de atribuição para  $K=2$ , onde a probabilidade de um indivíduo pertencer ao *cluster* (grupo) 1 é representada pela cor vermelha e ao *cluster* 2 pela cor verde, demonstrou que o grupo representado pela cor vermelha foi constituído pelos acessos provenientes da população de Ilha Grande e da população de Parnaíba. Da mesma forma, o grupo representado pela cor verde reuniu acessos provenientes das duas populações. O gráfico também indica a mistura de genomas, com todos os acessos, em menor ou maior proporção, apresentam duas cores. Como demonstrado, principalmente, pelo acesso BGCA37 que possui 58,7% de probabilidade do seu genoma está associado ao grupo vermelho e 41,3% ao grupo verde, sugerindo existir troca de alelos entre esses dois grupos (Figura 12).

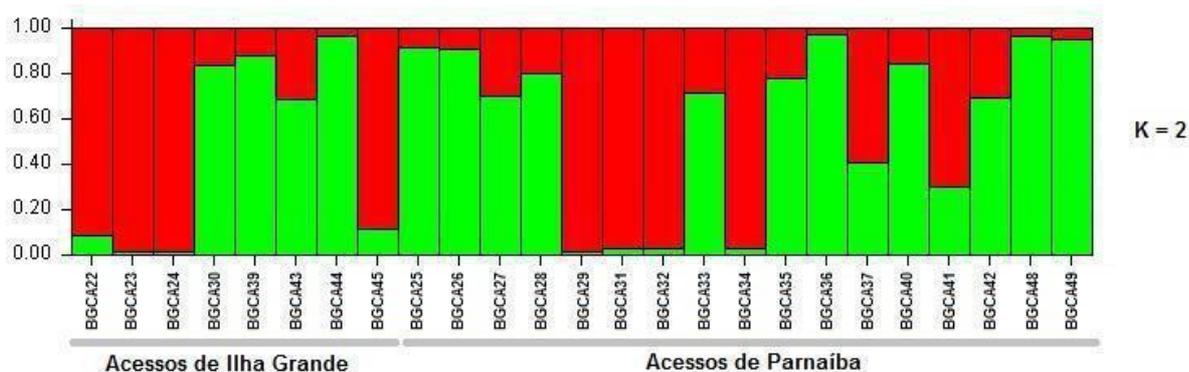


Figura 12 - Representação gráfica do teste de atribuição de acessos de cajuí provenientes da vegetação litorânea piauiense agrupados por regiões geográficas com valores de  $K = 2$ .

Uma análise complementar foi realizada com a finalidade de identificar a evidência de migrantes entre os grupos. Na representação gráfica desta análise, os pontos representam os acessos, identificado a população a qual pertence pelo padrão diferente de cores. Os vértices do triângulo representam os grupos (*clusters*), quanto mais próximo do vértice estiver um acesso, maior será a sua proximidade genética com o respectivo grupo. Em contrapartida, quando estes pontos são encontrados próximos a outros grupos indicam que este é um imigrante ou descendente de imigrantes recentes. Pela análise da Figura 13, observou-se em ambos os vértices uma sobreposição das duas populações analisadas, o que demonstrou que muitos acessos são imigrantes, ou tem antepassados imigrantes recentes.

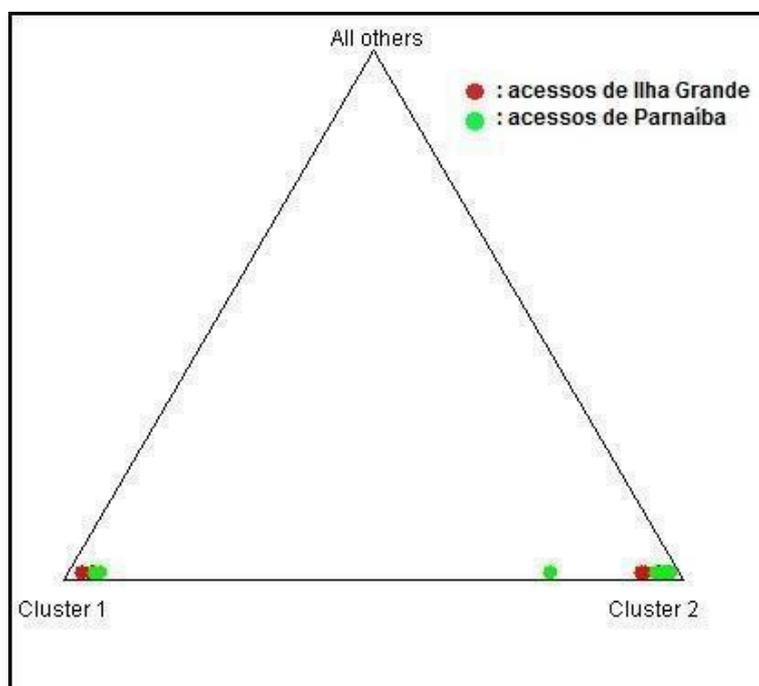


Figura 13 - Representação esquemática do teste de agrupamento pelo software Structure usando a função USEPOPINFO; MIGRPRIOR = 0,05 e GENSBACK = 3

O *cluster 1* foi constituído por 51,2 % dos indivíduos provenientes de Ilha Grande e 24,5 % dos indivíduos de Parnaíba. O *cluster 2* foi formado por 48,8 % dos indivíduos de Ilha Grande e 75,4 % dos indivíduos de Parnaíba.

#### 4.4 DISCUSSÃO

O uso de marcadores moleculares ISSR tem mostrado resultados bastante satisfatórios na caracterização de germoplasma, sendo mais eficientes na detecção de polimorfismo quando comparado a outros marcadores moleculares dominantes, como por exemplo, ao RAPD (THIMMAPPAIAH et al., 2009).

Os marcadores ISSR mostraram-se eficientes na caracterização e discriminação da diversidade genética dos acessos analisados. No total de 104 bandas foram geradas a partir de nove iniciadores ISSR, representando um percentual de polimorfismo de 91,3%. Este elevado polimorfismo foi semelhante ao descrito em estudos com *Anacardium* por meio de marcadores ISSR, mesmo quando avaliado um maior número de indivíduos (PESSONI, 2007; THIMMAPPAIAH et al., 2009), demonstrando que o BAG do Cajuí da Embrapa Meio Norte, mesmo sendo constituído por poucos acessos, apresenta elevada diversidade genética.

As estimativas de diversidade genética corroboraram com o elevado polimorfismo apresentado pelos iniciadores testados. Para cada locus, o índice de diversidade genética de Nei assume valores entre 0 e 0,5, enquanto que para o índice de Shannon ( $H'$ ) (por meio da expressão  $S' = e^{-H'}$ ), o maior valor assumido pode ser 2, ao aplicar a expressão tem-se  $S' = 1,52$ . Deste modo, os valores expressos por estes dois índices demonstrando alta diversidade genética em nível de todos os indivíduos.

Observou-se que o nível de diversidade apontado por estes dois índices difere entre as duas populações, com a população de Ilha Grande apresentando a menor diversidade e também o menor polimorfismo, entretanto estas estimativas tiveram forte influência do tamanho amostral, podendo não representar a verdadeira diversidade genética existente, visto que a população de Ilha Grande é composta apenas por oito acessos e a de Parnaíba por 17, o que é comprovado ao estimar a heterozigotidade média por meio a abordagem bayesiana proposta por Zhivotovsky (1999), por meio da qual se observou que a diversidade genética apresentada pelas duas populações é semelhante.

O coeficiente de similaridade de Dice-Sorensen apresentou uma variação de 65,29%, confirmando existir grande variabilidade genética entre os acessos pertencentes ao Banco de Germoplasma da Embrapa Meio-Norte.

Este nível de diversidade genética apresentado pelos acessos pode estar diretamente relacionada ao sistema de reprodução do gênero *Anacardium*, predominantemente alógama (BARROS, 1991), com polinização realizada principalmente por abelhas (FREITAS; PAXTON, 1998).

Os agrupamentos formados pelo método de UPGMA demonstram claramente que alguns acessos estão mais próximos daqueles coletados em outras localidades geográficas, do que dos procedentes do seu mesmo local de coleta. Uma relação importante a ser destacada é a estabelecida entre as espécies de *Anacardium* e os acessos de cajuí, observando-se uma mistura em relação não somente as localidades amostradas, mas também com as diferentes espécies do gênero, com exceção da *A. humille* que constitui um grupo diferenciado. Dentro do grande grupo formado, observa-se que a espécie *A. microcarpum* apesar de ser apontada por alguns autores como a provável espécie de cajuí do território piauiense apresentou certa distância com os acessos analisados, constituindo um subgrupo diferenciado.

As espécies *A. occidentale* e *A. microcarpum* são apontadas como as mais representativas do litoral piauiense (ANDRADE et al., 2012). *A. microcarpum* ainda é considerada a segunda mais abundante do gênero nas regiões de cerrado dos estados do Piauí e Maranhão (BARROS; PAIVA; CAVALCANTI, 1999). Entretanto a insuficiência de estudos de caracterização botânica para as plantas de cajuí do litoral piauiense, a proximidade genética entre cajuí proveniente da mesorregião sudoeste piauiense com as espécies *A. othonianum* e *A. occidentale* (PESSONI, 2007) e os resultados apresentados por este estudo indicam a possibilidade de outras espécies do gênero serem ocorrentes na região. Necessitando, por isso, de estudos taxonômicos, a fim de classificar a verdadeira espécie ou espécies de *Anacardium* ocorrente no litoral do Piauí.

Estes dados demonstram que os acessos apresentam elevada diversidade genética, sendo necessária a avaliação de como essa diversidade está estruturada. As duas populações são próximas geograficamente, distam apenas 8 Km. Deste modo, espera-se que exista pouca ou nenhuma diferenciação entre as duas populações amostradas, o que pôde ser confirmado pelas análises de estrutura e diferenciação genética populacional.

A estrutura genética das populações analisadas, inferida a partir da estimativa de  $G_{st}$ , mostra que as populações são bastante semelhantes, não existindo diferenciação entre elas. Isso é reforçado pelos resultados apresentados pela análise de agrupamento, que demonstra uma mistura entre os acessos, e pela AMOVA, evidenciando que toda a variabilidade genética observada está dentro das populações, gerando indícios de intenso fluxo gênico entre as duas populações, o que foi confirmado pelo alto valor de  $N_m$ .

Os elevados índices de fluxo gênico associado aos baixos valores de  $G_{st}$  indicam a intensa troca genética entre as duas populações, o que provavelmente é possível em função da grande variedade de agentes dispersores de pólen e fruto.

A castanha (fruto) está associada ao pedúnculo carnosos e suculento, que permite que esta flutue e seja dispersada pelos rios, além de ser um atrativo para pequenos animais, principalmente morcegos frugívoros que possuem a capacidade de dispersar o fruto a longas distâncias. Das 13 espécies de morcegos descritas como ocorrentes na região litorânea piauiense, quatro apresentam dieta frugívora, entre elas, as espécies *Artibeus lituratus* e *Carollia perspicillata* (ROCHA; PORTELLA, 2012). Estas duas espécies caracterizam-se pelo elevado número de áreas de alimentação visitadas e percorrerem grandes distâncias de forrageio por noite, podendo chegar até 8 Km para *A. lituratus* e 13 Km para *C. perspicillata* (GALINDO-GONZÁLEZ, 1998). O homem também atua como agente dispersor em *Anacardium* (MITCHELL; MORI, 1987). Esse elevado potencial de dispersão dos frutos associado às altas porcentagens de germinação apresentadas pelo cajuí (CORRÊA et al., 2002), proporcionam que esta dispersão se efetive em fluxo gênico.

Além da dispersão do fruto, a dispersão do pólen tem grande influência no fluxo gênico entre as populações. O principal agente polinizador em *Anacardium* são as abelhas, especialmente a *Apis mellifera* L. As abelhas melíferas, além de apresentarem comportamento forrageio adequado à polinização de *Anacardium*, (FREITAS; PAXTON, 1998; FREITAS; PAXTON; HOLANDA-NETO, 2002), podem percorrer grandes distâncias, em busca de alimentos florais desejáveis (HAGLE et al., 2011). A época de floração e frutificação do cajuzeiro coincide com a estação seca (RUFINO, 2004), onde

há pouca disponibilidade de recursos. Este cenário é favorável para que possa estar ocorrendo fluxo gênico entre as populações de cajuí mediada pelo pólen carregado pelas *A. mellifera* presentes na região.

As análises de estrutura e diferenciação populacional (AMOVA,  $G_{st}$ ) exigem a definição *a priori* das populações. Considerando a não associação entre os agrupamentos formados e o local de coleta dos acessos, essa definição prévia de populações pode não representar os agrupamentos biológicos originários, deste modo uma análise sem hierarquização *a priori* foi realizada no programa *Structure*.

A análise bayesiana obtida pelo *Structure* apresentou resultados em concordância com o mostrado pelas análises do método UPGMA, AMOVA, e  $G_{st}$  demonstrando que as localidades estudadas não podem ser consideradas como duas populações distintas. No entanto, é certo que há diferenciação dos acessos em dois grupos geneticamente distintos, apontando a existência de indivíduos que potencialmente possam ser híbridos ou migrantes. O padrão de cores indicando que alguns acessos não podem ser agrupados completamente em apenas um dos dois grupos é um indicativo de troca de alelos entre eles e, conseqüentemente, os dois grupos genéticos formados não estão desvinculados entre si.

Alguns fatores, ou mesmo a associação entre eles, podem ser apontados para explicar a mistura entre as duas populações. Um deles seria a evidência de mistura de genomas a partir de imigrantes ou descendentes de imigrantes recentes entre as duas populações. As semelhanças genéticas entre os acessos das diferentes populações fica evidente ao observar o teste de migrantes. Alguns acessos da população de Ilha Grande encontra-se próximo ao vértice do triângulo correspondente ao grupo 1 junto com alguns acessos da população de Parnaíba, ocorrendo sobreposição entre alguns deles. De modo semelhante, acessos provenientes das duas populações agrupam-se ao vértice do triângulo que corresponde ao grupo 2, com um acesso deslocando-se em direção ao grupo 1. Esses agrupamentos justificam a baixa diferenciação genética entre estas duas localidades apontada pelas demais estatísticas.

É importante ressaltar, que é conhecido apenas o local de coleta e não a origem geográfica dos acessos. O cajuí possui um fruto bastante atrativo e um

pedúnculo carnoso e suculento de grande interesse para a população local (RUFINO et al., 2008), como alguns acessos foram coletados em propriedades rurais, o homem pode ter atuado como agente de seleção (THIMMAPPAIAH et al., 2009) visando caracteres de interesse agrônomo. Portanto, esta mistura entre populações pode estar diretamente associada à ação humana promovendo o intercâmbio entre germoplasma de diferentes locais ou mesmo a introdução de cajuís geneticamente semelhantes nas duas populações analisadas.

Além disso, as fortes evidências de híbridos interespecíficos em condições naturais (MITCHELL; MORI, 1987), e o sucesso de cruzamentos interespecíficos artificiais, com a finalidade de obter genótipos superiores (CRISÓSTOMO, et al., 2002), produzindo indivíduos intermediários entre *A. occidentale* e outras espécies do gênero, indicam a existência de fracas barreiras reprodutivas e a viabilidade de cruzamentos naturais dentro do gênero. Populações naturais de cajuí da região litorânea piauiense apresentam morfometria foliar bastante semelhante às populações de *A. occidentale* desta região, um elevado grau de sobreposição não permite diferenciar estes dois grupos em relação a esta característica (VIEIRA; MAYO; ANDRADE, 2014), permitindo considerar a hipótese de existirem híbridos naturais entre *A. occidentale* e cajuí na região litorânea piauiense, constituindo uma importante evidência na explicação da organização da diversidade genética.

#### 4.5 CONCLUSÕES

Os marcadores ISSR foram eficientes na caracterização, avaliação da diversidade, e relações genéticas dos acessos de cajuí pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Cajuí da Embrapa Meio Norte.

O BAG do Cajuí da Embrapa Meio Norte apresenta elevada diversidade genética.

As similaridades genéticas, expressas pelo padrão de agrupamento, indicam certa distância entre os acessos de cajuí coletados no litoral piauiense e a espécie *A. microcarpum*, levantando questionamentos em relação à hipótese da provável espécie de *Anacardium* ocorrente nesta região.

As duas localidades amostradas não continuam populações diferenciadas. No entanto, de acordo com as análises bayesianas, a diversidade genética apresentada pelos acessos organiza-se em dois grupos geneticamente distintos. O que pode ser resultado da atuação de alguns fatores, ou mais provavelmente da associação entre eles. Como por exemplo, a ocorrência de imigrantes ou descendentes de imigrantes recentes, bem como da ação humana na manipulação de germoplasma de cajuí e possível ocorrência de híbridos interespecíficos.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, I. M. de, et al. Diversidade de Fanerógamas do Delta do Parnaíba – Litoral Piauiense. In: GUZZI, A. **Biodiversidade do Delta do Parnaíba: litoral piauiense**. Parnaíba: EDUFPI, 2012.
- BARROS, L. M. **Caracterização morfológica e isoenzimática do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) tipos comum e anão-precoce, por meio de técnicas multivariadas**. 1991. 256 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz- ESALQ, Piracicaba, 1991.
- BARROS, L. M.; PAIVA, J.R.; CAVALCANTI, J.J.V. Recursos genéticos de cajueiro: situação atual e estratégias para o futuro. In: QUEIROZ M.A.; GOEDERT C.O.; RAMOS S.R.R. Embrapa, Petrolina. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. p. 1–22, 1999.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p. 209–215, 2001.
- CARBAJAL, A. C. R.; SILVA JÚNIOR, N. Sebrae-CE/Embrapa, Fortaleza. **Castanha de caju: recomendações práticas para a melhoria da qualidade**. Agroindústria Tropical, 2003,16p.
- COLE, C. T., Genetic variation in rare and common plants **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst**, v.34, p.213–237, 2003.
- CORRÊA, M. P. F.; RUFINO, M. S. M.; VASCONCELOS, L. F. L.; RIBEIRO, V. Q.; SOARES, E. B.; ARAÚJO, E. C. E. Germinação e vigor de sementes de genótipos de cajuí (*Anacardium* spp.). In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 17, 2002, Belém. **Os novos desafios da fruticultura brasileira: anais**. Belém: SBF, 2002.
- CRESPO, M.F. V.; SOUZA, L. I de. **Cajuí: boas práticas e manejo sustentável**. Parnaíba: Siart, 2014.
- CRISÓSTOMO, J.R.; CAVALCANTE, J.J.V.; BARROS, L. de M.; ALVES, R.E.; FREITAS, J.G.; OLIVEIRA, J.N. Melhoramento do cajueiro anão-precoce: avaliação da qualidade do pedúnculo e a heterose dos seus híbridos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.477-480, 2002.
- CULLEY, T.M.; WOLFE, A.D. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens*, as indicated by isozyme and ISSR molecular markers. **Heredity**, v.86, p.545–556, 2001.
- QIAGEN ( Brasil - Dneasy Plant Handbook, 7) **DNEASY plant mini kit for miniprep purification of total cellular DNA from plant cells and tissues, or fungi**. São Paulo: QIAGEN, 2006.55p.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters

of individuals using the *software Structure*: a simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, p. 2611-20, 2005.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. L. **Arlequin versión 3.11**: a software for population genetic data analysis. Geneva: University of Geneva, 2007. (Software).

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, v.7, p. 574–578, 2007.

FREITAS, B.M.; PAXTON, R.J. A comparison of two pollinators: the introduced honey bee *Apis mellifera* and an indigenous bee *Centris tarsata* on cashew *Anacardium occidentale* in its native range of NE Brazil. **Journal of Applied Ecology**, v.35, p.109-121, 1998.

FREITAS, B. M.; PAXTON, R. J.; HOLANDA-NETO, J. P. Identifying Pollinators Among an Array of Flower Visitors, and the Case of Inadequate Cashew Pollination in NE Brazil. In: KEVAN P.; IMPERATRIZ-FONSECA V. L. (Eds.) - **Pollinating Bees-The Conservation Link Between Agriculture and Nature**. Brasília: Ministry of Environment. p.229-244, 2002.

GONZÁLES, JOSÉ GALINDO. Dispersion de semillas por murcielagos: su importancia en la conservacion y regeneracion Del bosque tropical. **Acta Zoologie Mexico**, v. 73, p. 57-54, 1998.

GUPTA, M., CHYI, Y-S. ROMERO-SEVERSON J. e OWEN, J.L.. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theor Appl Genet**, v.89, p.998–1006, 1994.

HAGLE, J.R; MUELLER, S.; TEUBER, L.R; MACHTLY, S.A; DENYNZE, A.V.; Foraging range of honey bees *Apis mellifera* in alfalfa seed productions. **Journal of Insect Science**, v.11, p. 1-12, 2011.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p.9, 2001.

LYNCH, M.; MILLIGAN, B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Mol Ecol.**, v.3, p.91–99, 1994.

MILLER, M.P. **Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data**. Distributed by the author, 1997.

MITCHELL, J.O.; MORI, S.A. The cashew and its relatives (*Anacardium occidentale* L.). **Memoirs of the New York Botanical Garden**, v. 42 , p. 1-76, 1987.

PESSONI, L. A. **Estratégias de Análise da Diversidade em Germoplasma de Cajueiro (*Anacardium spp.* L.)**. 2007. 159 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Washington, v. 155, p. 945-959, 2000.

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

ROCHA, C.R.; PORTELLA, A. de S. Morcegos do delta do Parnaíba, litoral piauiense. In: GUZZI, A. **Biodiversidade do Delta do Parnaíba: litoral piauiense**. Parnaíba: EDUFP, 2012.

RUFINO, M.S.M. **Qualidade e potencial de utilização de cajuís (*Anacardium spp.*) oriundos da vegetação litorânea do Piauí**. 2004. 92 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2004

RUFINO, M.S.M.; CORRÊA, M.P.F.; ALVES, R.E.; LEITE, L.A.S. Utilização atual do cajuí nativo da vegetação litorânea do Piauí, Brasil. **Proceedings of the Tropical Region - American Society for Horticultural Science**, v.52, p.147-149, 2008.

SHANNON, C.E.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communication**. Urbana: University of Illinois Press, 1949.

THIMMAPPAIAH; SANTHOSH, W.G.; SHOBHA, D.; MELWYN, G.S. Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR Markers. **Scientia Horticulturae.**, v.120, p.411–417, 2009.

VEKEMANS, X. **AFLP-SURV version 1.0**. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium, 2002.

VIEIRA, M.; MAYO, S. J.; ANDRADE, I. M. Geometric morphometrics of leaves of *Anacardium microcarpum* Ducke and *A. occidentale* L. (Anacardiaceae) from the coastal region of Piauí, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica.**, [s.v.;s.p.], 2014.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistic with special regard to systems of mating. **Evolution.**, v.19, p. 395-420, 1965.

WRIGHT, S. Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 4: **Variability within and among Natural Populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1978.

YEH F.C.; BOYLE, T.J.B. **Popgene v. 1.31. Microsoft Windows-based freeware for population analysis.**Edmonton: University of Alberta and Centre for International Forestry Research 1999.

ZHIVOTOVSKY, L.A. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. **Mol Ecol.**, v.8, p.907–913, 1999.

## **ANEXOS**

ANEXO A- Média dos descritores relacionados morfológicos e químicos, avaliados como variáveis contínuas em 18 acessos do BAG do Cajú da Embrapa Meio Norte.

ACESSO	CIN	LIN	NRIN	CPE	DPE	DBPE	DAPE	PPE	CCA	LCA	ECA	PCA	AMPL	DMC	pH	SST	ATT	SST/ATT
BGCA22	17,10	9,45	7,50	3,00	2,76	1,89	2,78	19,10	2,08	1,67	1,14	3,32	4,40	5,88	4,29	14,80	0,2	74,00
BGCA23	15,90	13,90	8,40	1,86	2,07	1,65	2,04	7,69	1,66	1,36	0,90	2,00	5,10	6,30	3,22	19,90	0,9	22,11
BGCA24	13,20	15,60	9,20	3,12	3,57	2,76	3,60	29,30	2,20	1,92	1,11	3,93	6,70	9,70	2,93	14,20	1,01	14,06
BGCA25	12,50	13,70	6,80	4,17	2,85	2,17	3,15	26,31	2,26	1,76	0,91	3,43	6,70	9,70	2,82	13,40	1,18	11,36
BGCA26	23,60	17,45	9,30	2,06	2,01	1,54	2,05	9,75	1,78	1,40	1,06	2,61	5,50	7,35	4,00	18,00	0,27	66,67
BGCA27	32,95	25,60	9,30	2,25	3,05	2,92	2,20	16,64	1,96	1,61	1,05	2,94	3,50	4,70	3,42	15,00	0,4	37,50
BGCA28	13,70	18,30	7,30	4,76	4,01	3,05	3,92	52,38	2,21	1,74	0,94	3,43	7,20	12,05	2,75	10,20	1,0	10,20
BGCA29	32,15	26,25	10,40	2,13	2,80	2,28	2,74	13,80	2,12	1,64	1,01	3,01	8,40	10,75	3,69	13,40	0,5	26,80
BGCA30	15,80	27,10	9,50	2,33	2,88	2,17	2,68	15,54	2,08	1,52	0,84	2,69	3,10	5,70	3,24	13,00	0,6	21,67
BGCA31	16,30	16,15	8,60	2,02	2,31	1,51	2,18	10,02	1,69	1,37	0,89	2,06	7,10	8,65	3,11	14,00	0,7	20,00
BGCA32	18,70	16,25	8,90	1,77	2,17	1,87	1,91	7,89	1,54	1,27	0,80	1,61	4,50	7,90	3,08	14,00	1,0	14,00
BGCA33	24,70	21,15	7,60	2,51	2,45	1,78	2,36	11,73	1,99	1,64	1,02	2,93	5,30	6,30	3,14	17,00	1,0	17,00
BGCA34	28,15	25,80	10,60	2,26	2,97	2,40	2,65	16,22	1,90	1,51	1,09	2,94	4,70	5,50	2,35	12,00	2,1	5,71
BGCA35	14,60	20,70	9,10	2,67	3,09	2,38	2,88	19,78	2,15	1,65	0,87	2,94	4,00	5,65	3,24	13,20	0,6	22,00
BGCA36	25,75	22,25	11,00	2,49	2,61	1,87	2,30	11,78	1,59	1,30	0,69	1,63	5,70	8,40	3,35	17,00	0,5	34,00
BGCA37	22,30	27,00	10,50	2,51	2,30	1,71	2,21	10,38	1,89	1,58	0,84	2,21	4,20	5,10	2,88	13,60	0,8	17,00
BGCA45	34,80	28,90	11,10	4,39	3,36	2,20	3,51	25,24	2,54	2,02	1,14	3,09	5,70	6,80	3,20	13,90	1,3	10,69
BGCA48	14,80	15,15	8,00	6,23	5,36	4,70	5,62	96,05	3,70	2,85	1,91	8,61	3,30	5,10	5,42	16,10	0,2	80,50
<b>MÉDIA</b>	<b>20,94</b>	<b>20,04</b>	<b>9,06</b>	<b>2,92</b>	<b>2,92</b>	<b>2,27</b>	<b>2,82</b>	<b>22,20</b>	<b>2,07</b>	<b>1,66</b>	<b>1,01</b>	<b>3,08</b>	<b>5,28</b>	<b>7,31</b>	<b>3,34</b>	<b>14,59</b>	<b>0,78</b>	<b>28,07</b>
Desvio	7,34	5,73	1,31	1,20	0,81	0,76	0,91	21,30	0,48	0,36	0,26	1,52	1,49	2,15	0,69	2,29	0,47	22,61

