

Universidade Federal do Piauí

**Diversidade e estrutura genética em populações de *Anacardium*
spp. do Parque Nacional de Sete Cidades (PI) por meio de
marcadores ISSR**

Maria Fernanda da Costa Gomes

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
2017**

**Maria Fernanda da Costa Gomes
Licenciada em Ciências Biológicas**

**Diversidade e estrutura genética em populações de *Anacardium* spp. do
Parque Nacional de Sete Cidades (PI) por meio de marcadores ISSR**

**Orientador:
Dr. Sérgio Emílio dos Santos Valente
Coorientadores:
Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima
Dr. Lúcio Flavo Lopes Vasconcelos**

**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
2017**

Diversidade e estrutura genética em populações de *Anacardium* ssp. do Parque Nacional de Sete cidades (PI) por meio de marcadores ISSR

Maria Fernanda da Costa Gomes

Aprovada em ____/____/____

Comissão julgadora:

Dr. Paulo Fernando de Melo Jorge Vieira – Embrapa Meio-Norte

Dr. Leonardo Castelo Branco Carvalho – CCA/UFPI

Dra. Francielle Aline Martins - UESPI/Suplente

**Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima – Embrapa Meio-Norte
Coorientador**

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

Ofereço

À Deus, sem a iluminação divina nada seria possível.

Dedico

À minha prima Mônica Moura, pelo exemplo de força e fé;

Aos meus pais, Pedro e Lenilda Gomes, por todo amor, confiança e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser o meu guia e protetor, por estar sempre comigo e mostrar que é possível, e que a perseverança e a fé são as forças vitais que nos permitem crescer;

À Universidade Federal do Piauí, por me permitir novas experiências de vida e mais uma etapa de formação acadêmica;

À Embrapa-Meio Norte, por todo o suporte técnico necessário para a realização desse trabalho e por me fazer crescer tanto como pessoa quanto profissionalmente;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES), pelo apoio financeiro;

Ao professor Dr. Sérgio Emílio dos Santos Valente, por me orientar desde a graduação, pela confiança e por ser tão humano mesmo no meio científico, algo raro nos dias de hoje; mais que um orientador, um amigo e exemplo para a vida toda;

Ao Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima, por toda a sensibilidade, preocupação e por todo o aprendizado durante esse período. Com o senhor aprendi que compromisso é sinônimo de pontualidade, mas acima de tudo significa o cuidado com o próximo.

Ao Dr. Jaime Martínez Castillo, pela generosidade e disponibilidade em contribuir com a interpretação dos dados e das análises estatísticas;

Ao Dr. Lúcio Flavo Lopes Vasconcelos, pelas contribuições para a realização e melhoria deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (UFPI), por todo o esforço em formar bons profissionais.

À professora Dra. Maria Edileide Alencar Oliveira, por todo o apoio nas coletas de campo e por fazer tudo de coração. Obrigada por todos os ensinamentos e por tornar nossas viagens sempre divertidas, apesar do cansaço.

À Artemisa Nazaré Costa Borges, pela generosidade, por estar sempre disponível a colaborar, pelos conselhos e ensinamentos.

À Giovana Sarah Sales Batista, minha fiel companheira de campo, sua ajuda foi essencial para a realização desse trabalho.

À Samara Raquel de Sousa, Ruth Raquel Farias e Nonato Lopes, por me permitirem conhecer melhor o Parque Nacional de Sete Cidades (PI).

À todos os amigos de turma, Eliene Pereira (conselheira de todas as horas), Eugênia Medeiros (sensibilidade em pessoa), Jéssica Barbara Viana (companheira de bancada), Marilha Vieira, Yêda Gabriela Silva, Raquel Veras e Pedro Neto, juntos conseguimos superar cada obstáculo e da melhor forma possível.

Aos amigos Max Brandão e José Eduardo Vasconcelos, por fazerem parte da nossa turma e só acrescentarem coisas boas ao nosso grupo.

À toda a equipe de amigos da Embrapa Meio-Norte, Geice Ribeiro, Willame Rodrigues, Antônia Farias, Jarbson Oliveira, Raiane Oliveira e Leonardo Furtado pela colaboração e companheirismo. Em especial agradeço à Gizele de Andrade Luz, por toda a paciência em me orientar e ajudar em cada etapa; e ao querido Jailson Santos, por ser tão generoso e por todo o carinho.

Aos meus pais, Pedro Gomes Sobrinho e Lenilda da Costa Gomes, por todo amor e por me apoiarem em cada escolha, sem medir esforços para que mais esse sonho fosse alcançado. Agradeço a Deus por ter me concedido pais tão responsáveis e equilibrados. Vocês sempre serão o meu alicerce e espelho de vida.

Aos meus irmãos, Fernando da Costa Gomes e Carlos Adriano da Costa Gomes, por serem exemplos de dedicação e de profissionais; obrigada por todo o apoio e carinho.

Aos meus avós, Antônia Mocinha Costa e José Fernandes, por todo amor e apoio.

À minha cunhada, Edna Borges; e ao meu primo Marcelo Moura e esposa Suzane Mendes, por toda a união que acrescentaram à nossa família.

Aos velhos e bons amigos, Beatriz Rodrigues, Hyrla Matos, Willyanna Fernandes, Ronielton Costa, Rafael Araújo, Wânia Lima, Laíra Veron, Wanderson Moura e Hêmenon Santos, pela amizade sincera e companheirismo.

Ao meu companheiro, Marcones Ferreira Costa, por todo amor e carinho, pelo exemplo de vida e por ser o primeiro leitor e crítico desse trabalho. Sou muito grata por todo o apoio.

À banca avaliadora, por todas as contribuições para a melhoria desse trabalho.

Enfim, a todos que torceram e contribuíram de alguma forma para que esse sonho se tornasse realidade. Obrigada a todos!

“Depois de algum tempo você aprende que o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida... E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais.”

William Shakespeare

SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
LISTA DAS FIGURAS	XI
LISTA DAS TABELAS.....	XII
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Gênero Anacardium	15
2.2 Cajuí: Importância sócio-econômica	16
2.3 Marcadores moleculares aplicados ao estudo genético de plantas	18
2.4 Marcadores Moleculares ISSR	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Material Vegetal	21
3.2 Extração e quantificação de DNA	22
3.3 Reação em Cadeia da Polimerase.....	23
3.4 Análises Estatísticas.....	24
4 RESULTADOS.....	25
4.1 Similaridade Genética	25
4.2 Diversidade Genética	28
4.3 Estrutura e Diferenciação Genética	28
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÕES	35
7 REFERÊNCIAS.....	36

RESUMO

GOMES, M. F. C. **Diversidade e estrutura genética em populações de *Anacardium* spp. do Parque Nacional de Sete Cidades (PI) por meio de marcadores ISSR.** 42p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), UFPI, Teresina, 2017.

O cajuí (*Anacardium* spp.) é um fruto nativo do cerrado que apresenta potencial para comercialização. Entretanto, a exploração dá-se exclusivamente pelo extrativismo, onde não há estratégias de conservação, o que pode levar à perda de variabilidade genética. Uma vez que o conhecimento da diversidade genética é essencial aos programas de melhoramento e conservação, o objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade e estrutura genética de 56 acessos de 03 populações de cajuí do Parque Nacional de Sete Cidades (PNSC-PI, Brasil) e 02 acessos de caju (grupo externo) por meio de 11 *primers* ISSR, visando à incorporação dos acessos mais divergentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Meio-Norte. Obteve-se um total de 112 locos, dos quais 93 foram polimórficos. A similaridade entre os acessos foi estimada por meio do coeficiente de Dice-Sorensen que variou de 0,60 a 0,94. Os acessos apresentam uma moderada variabilidade genética, demonstrada pelos índices de diversidade. A diversidade genética de Nei e o índice de Shannon variaram, respectivamente, de 0,2227 a 0,2691 e de 0,3322 a 0,4026. A AMOVA indicou que 96,17% da variabilidade genética encontra-se dentro das populações, o que representa pouca diferenciação entre as mesmas ($\Phi_{ST} = 0,03828$). A análise Bayesiana indicou a existência de quatro grupos genéticos vinculados entre si. Portanto, os três pontos amostrados não constituem subpopulações devido ao elevado fluxo gênico ($Nm = 6,7$) intensificado pela biologia floral de *Anacardium*, assim como por polinizadores e pequenos animais, dispersores da semente. Os acessos C-22 e C-26 foram os mais divergentes e, portanto, os recomendados à incorporação ao BAG da Embrapa Meio-Norte. Os resultados obtidos nesse estudo são úteis a pesquisas futuras voltadas à conservação da variabilidade genética desses materiais.

Palavras-chave: Cajuí, conservação dos recursos genéticos, frutos nativos do cerrado, variabilidade genética

ABSTRACT

GOMES, M. F. C. **Genetic diversity and structure in populations of cajuí (*Anacardium* spp.) from the Parque Nacional de Sete Cidades (PI) by ISSR markers.** 42p. Dissertation (Master of Genetics and Breeding), UFPI, Teresina, 2017.

The cajuí (*Anacardium* spp.) is a native fruit of the savanna and possess potential for commercialization. However, exploitation occurs exclusively through extractivism, where there are no conservation strategies, which can lead to loss of genetic variability. The knowledge about genetic diversity is necessary to conservation and breeding programs. Thus, this study aimed to evaluate the genetic diversity and structure of 56 cajuí accessions from three natural populations of the Parque Nacional de Sete Cidades (PNSC-PI, Brazil) and 02 cashew accessions (external group) by 11 ISSR markers, aiming at the incorporation of the most divergent accesses to the germplasm bank of Embrapa Meio-Norte. It was obtained 112 markers, 93 of which were polymorphic. The similarity obtained by Dice-Sorensen coefficient of individuals ranged between 0,60 and 0,94. The moderate levels of genetic diversity identified in the accesses were demonstrated by the values of the diversity indices. Nei's genetic diversity and Shannon index ranged from 0.2227 to 0,2691 and from 0,3322 to 0,4026, respectively. The AMOVA indicated that 96.17% of the genetic variability is within the populations, and they present low genetic differentiation ($\Phi_{ST} = 0,03828$). The Bayesian approach indicated the existence of four genetic groups connected. Therefore, the three collection sites are not consist in subpopulations due to the high gene flow ($Nm = 6.7$) favored by the floral biology of *Anacardium*, as well as by pollinators and small animals, seed dispersers. Accessions C-22 and C-26 were the most divergent and, therefore, those recommended for the incorporation to the germplasm bank of Embrapa Meio-Norte. The data generated in this study will guide further research aimed conservation of these materials.

Key words: cajuí, conservation of genetic resources, savanna native fruits, genetic variability

LISTA DAS FIGURAS

- Figura 1 - Cajuí (*Anacardium* spp.) (a) Inflorescência; (b) Fruto (castanha) e pseudofruto (pedúnculo) do Parque Nacional de Sete Cidades (PI).
Fonte: GOMES (2016).15
- Figura 2 - Área de estudo, Parque Nacional de Sete Cidades, Piracuruca e Brasileira, Piauí, Nordeste do Brasil. Adaptado por: FERREIRA, D. S. 2015.21
- Figura 3 - Perfil eletroforético obtido a partir da amplificação do DNA de 27 acessos de cajuí do Parque Nacional de Sete Cidades distribuídos em duas populações, Descoberta (12) e Lagoa Seca (15) com o *primer* 834 (UBC). Branco – controle negativo.26
- Figura 4 - Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA a partir do coeficiente de similaridade genética de Dice-Sorensen de 56 acessos de *Anacardium* spp. provenientes do PNSC (PI, Brasil) e 02 acessos de caju (grupo externo), obtido a partir de 112 locos, dos quais 93 foram polimórficos, produzidos por meio de 11 *primers* ISSR.27
- Figura 5 - Valores de ΔK estimados para as populações de *Anacardium* spp., conforme o proposto por Evanno; Regnaut e Goudet. (2005).29
- Figura 6 - Representação gráfica do Structure mostrando os acessos de *Anacardium* spp. distribuídos em quatro grupos genéticos.30

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1 - Caracterização das populações de cajuí coletadas no Parque Nacional de Sete Cidades, Piracuruca e Brasileira (PI), Brasil.	22
Tabela 2 - Primers ISSR (UBC) usados na caracterização molecular de 58 acessos de <i>Anacardium</i> spp.....	23
Tabela 3 - Locos amplificados e polimorfismo gerado a partir de 11 <i>primers</i> ISSR.	25
Tabela 4 - Estimativas de diversidade genética, número de migrantes e diferenciação genética das três populações de <i>Anacardium</i> spp.....	28
Tabela 5 - Análise de Variância Molecular entre e dentro das três populações de <i>Anacardium</i> spp.	28

1 INTRODUÇÃO

O cerrado brasileiro possui uma flora rica em espécies frutíferas com grande potencial de exploração. As fruteiras nativas desse bioma são tradicionalmente utilizadas pela população local, representando uma forma alternativa de geração de renda (GOMES et al., 2013; PEREIRA; SANTOS, 2015).

Dentre os frutos comumente utilizados do cerrado, destaca-se o cajuí (*Anacardium* spp.). O termo cajuí é usado para descrever espécies do gênero *Anacardium* que apresentam castanhas e pedúnculos pequenos (CARBAJAL; SILVA JÚNIOR, 2003).

O aproveitamento do cajuí envolve tanto a castanha (fruto), consumida sozinha ou na composição de sorvetes, quanto o pedúnculo (pseudofruto), que é nutritivo e pode ser consumido *in natura* ou na produção de doces, temperos e bebidas (RUFINO et al., 2008).

Além disso, o cajuí apresenta propriedades medicinais, por possuir altos teores de compostos antioxidantes; e desempenha papel ecológico, uma vez que é caracterizado como vegetação pioneira das dunas (BARBOSA-FILHO et al., 2014; CRESPO; SOUZA, 2014).

Embora o cajuí apresente potencial econômico tanto para o mercado de frutas *in natura* quanto para o processamento, a exploração dá-se exclusivamente pelo extrativismo, o que pode levar à perda de variabilidade genética (GOMES et al., 2011). Desse modo, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de estratégias de conservação dessas espécies.

Populações naturais de cajuí são encontradas no Parque Nacional de Sete Cidades (PNSC), uma unidade federal de conservação do cerrado localizada no estado do Piauí (COSTA et al., 2016). Apesar da importância do PNSC, os trabalhos realizados até o momento estão relacionados aos aspectos vegetacionais e há poucos estudos sobre a diversidade e estrutura genética das populações dessa região.

Uma etapa fundamental para promover estratégias de conservação dos recursos genéticos é o conhecimento da diversidade genética. Além disso, essa é uma informação essencial aos programas de melhoramento genético, pois permite selecionar acessos divergentes que podem representar cruzamentos promissores (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2012; SANTANA et al., 2016).

A variação genética pode ser acessada por meio de marcadores moleculares, que revelam polimorfismo ao nível de DNA e não sofrem influência ambiental (KUMAR et al., 2009; SANTANA et al., 2016). Marcadores dominantes, como os ISSR, são ferramentas úteis para analisar a diversidade genética, principalmente, em organismos não-modelo ou pouco estudados (VELEZ et al., 2016), como é o caso das espécies de cajuí.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade e estrutura genética de 56 acessos de cajuí de três populações naturais do Parque Nacional de Sete Cidades (PI, Brasil) e 02 acessos de caju (grupo externo) por meio de marcadores ISSR, visando à incorporação dos acessos mais divergentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Meio-Norte (PI), bem como auxiliar programas de conservação da variabilidade genética.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Anacardium*

Anacardium (L.) é o gênero tipo da família Anacardiaceae e está distribuído naturalmente desde Honduras na América Central, até o sul do Paraná e leste do Paraguai; e possui dois centros de diversidade: um centro localizado na Amazônia Central, ilustrado pela ocorrência de quatro espécies (*Anacardium giganteum*, *A. microsepalum*, *A. parvifolium* e *A. spruceanum*) nas cercanias de Manaus e outro centro localizado no Planalto Central do Brasil, onde três espécies correlatas (*A. cobrybosum*, *A. humile* e *A. nanum*) ocupam o mesmo habitat (MITCHELL; MORI. 1987).

De acordo com Mitchell e Mori (1987), os primeiros descritores das características gerais, *Anacardium* é um pequeno gênero de árvores, arbustos e subarbustos nativos dos neotrópicos. As flores estão reunidas em inflorescência do tipo panícula, rácimo composto com forma piramidal, com flores hermafroditas estaminadas (Figura 1a).

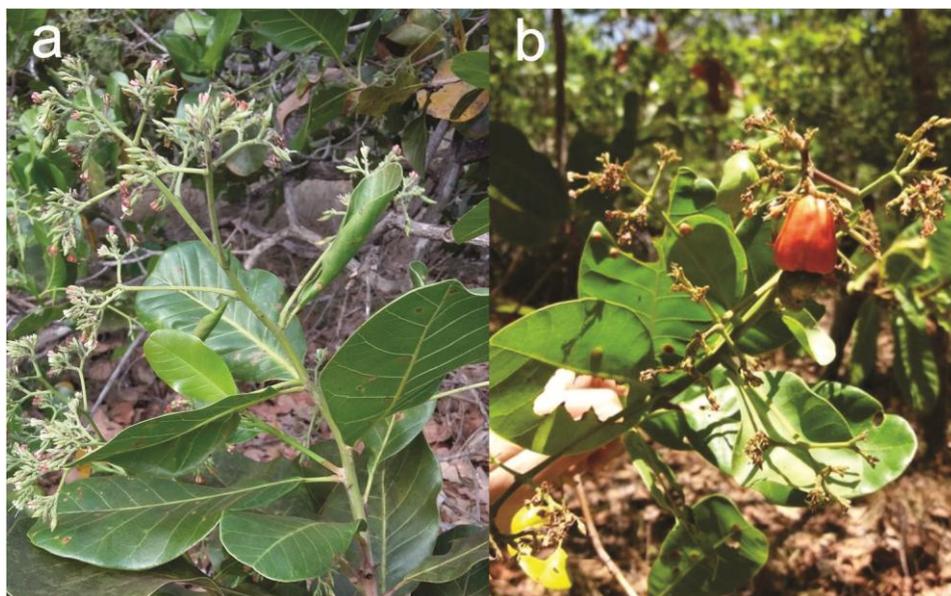


Figura 1 - Cajuí (*Anacardium* spp.) (a) Inflorescência; (b) Fruto (castanha) e pseudofruto (pedúnculo) do Parque Nacional de Sete Cidades (PI). Fonte: GOMES (2016).

Segundo a taxonomia clássica, existem, aproximadamente, 20 espécies de *Anacardium* (FERREIRA, 1973). Contudo, Mitchell e Mori (1987) reconheceram apenas 10 espécies na revisão taxonômica atual do gênero. Dentre as quais, conforme Lima (1988), as espécies classificadas como cajuí são: *A. amilcarianum*, *A. giganteum*, *A. humile*, *A. microcarpum*, *A. nanum* e *A. pumilum*.

O cajuí apresenta uma grande dispersão na região Nordeste do Brasil, especialmente nas áreas de cerrado. No Piauí, esta dispersão estende-se além dos cerrados, com populações naturais desta planta encontradas em zonas de transição, como nos tabuleiros costeiros o que constitui característica da vegetação litorânea (RUFINO et al., 2007).

A única espécie do gênero *Anacardium* cultivada comercialmente é o caju (*Anacardium occidentale* L.), sendo também a de maior dispersão (BARROS; CRISÓSTOMO, 1995). As demais espécies desse gênero, em particular as classificadas como cajuí, tem sua importância econômica restrita ao consumo local nas zonas produtoras. Isto foi relatado por Costa et al. (2010) no estudo realizado com duas espécies nativas da região Centro-Oeste do Brasil, *A. othonianum* e *A. humile*, que apesar de serem pouco conhecidas e consumidas apresentam grande importância para a população regional.

2.2 Cajuí: Importância sócio-econômica

A região Meio-Norte do Brasil apresenta uma rica biodiversidade, na qual se destacam as frutíferas nativas. São espécies de plantas com potencial econômico tanto para o mercado de frutas *in natura* quanto para o processamento (RUFINO, et al., 2008). Uma dessas fruteiras é o cajuzeiro (*Anacardium* spp.), cujo fruto, o cajuí, é comumente utilizado pela população local (Figura 1b).

No estado do Piauí, o cajuí é um dos principais recursos naturais utilizados pelas comunidades da Ilha Grande de Santa Isabel, situada nos municípios de Ilha Grande e Parnaíba; área de grande ocorrência das espécies de cajuí. De modo que a obtenção do fruto e pseudofruto para consumo e comercialização é temporal e extrativista (SOUZA; CRESPO, 2015).

O fruto é caracterizado, pela indústria processadora de castanha de caju, por um peso médio $\leq 3,33$ g, ou seja, as castanhas passariam na peneira de 15 mm e um quilo seria constituído por mais de 300 unidades (CARBAJAL; SILVA JÚNIOR, 2003).

O cajuí apresenta coloração entre amarela e vermelha sendo considerado uma fonte alternativa de nutrientes. A sua polpa se constitui, em média, por 1,18 g.100 g⁻¹ de proteína, 0,63 g.100 g⁻¹ de lipídios, 6,97 g.100 g⁻¹ de carboidratos, perfazendo energia metabolizável total de 38,27 kcal.100 g⁻¹ (SILVA et al., 2008).

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. O pedúnculo, por sua vez, possui teores consideráveis de açúcares, compostos fenólicos e minerais, sendo consumido *in natura* ou na produção de doces, temperos e bebidas (RUFINO et al., 2008).

Dado o seu teor de proteína considerável, fibras e ferro, pode ser utilizado na produção de granola que é altamente nutritiva (SOUZA; SILVA, 2015). Além disso, a polpa de cajuí apresenta potencial para a fabricação de iogurtes, devido ao sabor e aroma peculiares (FONSECA et al., 2014).

Embora apenas a espécie *Anacardium occidentale* L., seja cultivada e comercializada, é importante ressaltar que a maioria dos pedúnculos de cajuí relatados na literatura apresenta firmeza superior aos pedúnculos do caju. Essa característica está associada a uma maior resistência durante o manejo pós-colheita, o que resulta no prolongamento da vida útil e da qualidade do pseudofruto (ALMEIDA, 2009).

Outra característica importante é o conteúdo de vitamina C. Dentre alguns frutos do cerrado analisados como caigata, chichá, jatobá e macaúba, o cajuí destacou-se em relação ao conteúdo de ácido ascórbico, o qual apresentou alto teor equiparando-se ao caju (SILVA; MARTINS; DEUS, 2009; ROCHA et al. 2013). Desse modo, o cajuí apresenta potencialidades para o aproveitamento industrial.

Espécies de cajuí são ainda utilizadas para fins medicinais. Uma vez que possui altos conteúdos de compostos fitoquímicos, como compostos fenólicos e flavonóides que funcionam como antioxidantes, infusões de *A. microcarpum* podem ser utilizadas como agentes preventivos ou terapêuticos em patologias na qual ocorre estresse oxidativo celular (BARBOSA FILHO et al., 2014).

Outra espécie de cajuí, *Anacardium humile*, comparada a outras fruteiras do cerrado (chichá, jatobá-do-cerrado e macaúba), apresentou frutos com maior poder antioxidante *in vitro*, tanto no extrato aquoso quanto no alcoólico (ROCHA et al., 2013).

Além disso, o cajuzeiro desempenha um importante papel ecológico uma vez que se encontra distribuído em regiões litorâneas, caracterizando-se como a vegetação pioneira das dunas (CRESPO; SOUZA, 2014). Entretanto, as espécies de cajuí são suscetíveis sob o ponto de vista de exploração dos ecossistemas, pois são espécies exploradas exclusivamente pelo extrativismo onde não há estratégias de conservação (RUFINO, et al., 2008).

2.3 Marcadores moleculares aplicados ao estudo genético de plantas

Durante as últimas décadas, vários estudos sobre genética e biotecnologia de plantas têm sido desenvolvidos. Uma característica de destaque nesses trabalhos é o uso crescente dos marcadores moleculares que revelam polimorfismo ao nível de DNA. Desta forma, os marcadores de DNA tornaram-se uma importante ferramenta para o estudo da diversidade genética o que tem contribuído com a biotecnologia vegetal (KUMAR et al., 2009).

Os marcadores de DNA são fragmentos de DNA que revelam variações, deleção, inserção e substituição entre diferentes genótipos ou alelos de um gene para uma determinada sequência de DNA em uma população ou *pool* de genes (JIANG, 2013). Estes marcadores são estáveis e aplicáveis em qualquer tecido vegetal independentemente do desenvolvimento e diferenciação, uma vez que não sofrem os efeitos ambientais, pleiotrópicos e epistáticos (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008).

Um marcador de DNA para ser considerado ideal deve apresentar os seguintes critérios: detectar alto nível de polimorfismo; ter distribuição uniforme ao longo de todo o genoma; ser co-dominante, ou seja, ter capacidade de distinguir heterozigotos e homozigotos; fornecer resolução adequada de diferenças genéticas; ser simples, rápido e barato; requerer pouca quantidade de DNA e não necessitar de conhecimento prévio do genoma de uma espécie. Entretanto, é extremamente difícil encontrar um marcador molecular que apresenta todas estas características reunidas, portanto, a escolha do marcador vai depender do objetivo do estudo, das

espécies envolvidas e dos recursos financeiros disponíveis (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008; JIANG, 2013).

Os marcadores de DNA, devido à sua estabilidade e facilidade de uso, são amplamente utilizados em estudos de diversidade genética, seleção assistida por marcadores, mapeamento genético, DNA *fingerprinting*, relações filogenéticas, dentre outras (PRIYONO; PUTRANTO, 2014; BUHROO; GANAI; BHAT, 2016). Assim, representam uma ferramenta poderosa para o melhoramento de plantas.

2.4 Marcadores Moleculares ISSR

ISSR (*Inter-simple sequence repeats*) são regiões no genoma situadas entre sequências microssatélites. A técnica consiste em amplificar essas regiões, via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), usando um único iniciador que resultará na amplificação de inúmeros fragmentos de DNA. Cada fragmento obtido a partir da mesma reação de PCR é considerado um loco, portanto, ISSR são marcadores dominantes multilocos úteis em estudos de variabilidade genética (NG; TAN, 2015).

Os iniciadores ISSR normalmente apresentam um comprimento entre 16 e 25 pares de bases, de modo que as repetições microssatélites usadas podem ser di, tri, tetra ou pentanucleotídicas. A temperatura de anelamento varia em torno de 45 a 60°C e os iniciadores podem apresentar três formas: os não ancorados, consistem apenas de um motivo repetido; e os ancorados na ponta 5' ou na 3', ambos apresentam, além do motivo repetido, um ou mais nucleotídeos em cada uma das extremidades (VIJAYAN, 2005; TIWARI et al., 2015).

Entre os vários marcadores de DNA disponíveis, a metodologia de ISSR é considerada de baixo custo. Além do que, apresenta as seguintes vantagens: simples, rápida, reprodutível e que revela alto polimorfismo (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002; TIWARI et al., 2015).

Os marcadores ISSR são mais confiáveis e robustos do que os marcadores RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), principalmente devido ao método de detecção, e, possivelmente, também pelo o fato de que os iniciadores são mais longos e, portanto, mais específicos. Além disso, permitem o estudo de espécies mesmo sem o conhecimento prévio do genoma e, por isso, são mais rapidamente aplicados do que os marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats*) (GROVER; SHARMA, 2014).

A aplicabilidade dos marcadores ISSR é ampla, são empregados em estudos de DNA *fingerprinting* (ADHIKARI et al., 2014; SINGH; SENGAR, 2015) , desenvolvimento de marcadores microssatélites (LIEW; HO; PANG, 2015), relações filogenéticas (GHORBEL et al., 2014) e construção de mapas genéticos (QUEZADA et al., 2014). Além disso, os ISSRs são ferramentas úteis para analisar a diversidade genética, principalmente, em organismos não-modelo ou pouco estudados (VELEZ et al., 2016), como é o caso das espécies de cajuí.

Os marcadores ISSR são aplicados a estudos de caracterização da diversidade genética das espécies do gênero *Anacardium*, uma vez que se mostraram mais eficientes em relação aos marcadores RAPD e revelaram um maior percentual de polimorfismo ao serem aplicados em um estudo que avaliou a variabilidade genética de 25 genótipos de caju (*A. occidentale*). Do mesmo modo, os marcadores ISSR também se sobressaíram em relação aos RAPDs, em outro trabalho que avaliou 146 acessos de caju na Índia (SHOBHA; THIMMAPPAIAH; JOSE, 2013; DASMOHAPATRA et al., 2014).

Portanto, uma vez que as informações sobre o genoma das espécies de cajuí são escassas, os marcadores ISSR são ferramentas apropriadas para acessar e caracterizar a diversidade genética de *Anacardium* spp.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Coletou-se 56 acessos de *Anacardium* spp. em área de Cerrado no Parque Nacional de Sete Cidades, localizado entre os municípios de Brasileira e Piracuruca (PI), Região Nordeste do Brasil (Figura 2). Os acessos foram distribuídos em três populações conforme o ponto de coleta (Tabela 1). Os indivíduos 31, 33, 35 e 37 foram excluídos das análises, pois não resultaram em DNA de qualidade o que prejudicou as reações de amplificação.

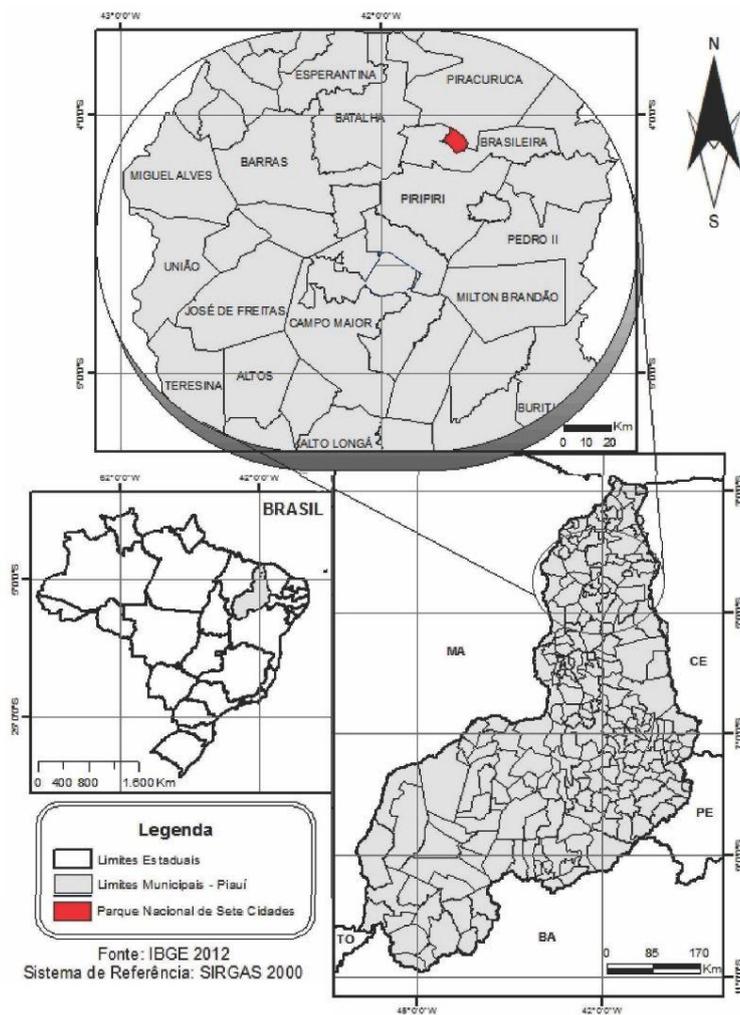


Figura 2 - Área de estudo, Parque Nacional de Sete Cidades, Piracuruca e Brasileira, Piauí, Nordeste do Brasil. Adaptado por: FERREIRA, D. S. 2015.

Tabela 1 - Caracterização das populações de cajuí coletadas no Parque Nacional de Sete Cidades, Piracuruca e Brasileira (PI), Brasil.

Populações	Identificação	Distância entre as populações (Km)	Nº de Indivíduos	Acessos	Fitofisionomia do Cerrado
Descoberta	A	7,6 (A-B)	12	1 – 12	Cerrado Típico e Rupestre
Lagoa Seca	B	4,7 (B-C)	24	13 - 30, 32, 34, 36, 38, 39 e 40	Cerrado Típico
5ª Cidade	C	4,5 (A-C)	20	41 – 60	Cerradão

Os pontos de coleta encontram-se distribuídos em diferentes fitofisionomias do Cerrado (Tabela 1). As características de cada fitofisionomia dentro do PNSC são: Cerrado Típico, caracterizado por apresentar o estrato herbáceo-subarbusivo e o arbustivo-arbóreo, o último com altura em torno de 5m, e plantas tortuosas com ramificações irregulares e retorcidas; Cerrado Rupestre, plantas pouco desenvolvidas de até 2 m de altura ocorrendo em ambientes rochosos; e o Cerradão, formação florestal na qual as árvores são altas e retas com altura média de 7 m (CASTRO; ARZABE; CASTRO, 2010).

Além disso, dois acessos de caju (Caju I e Caju II), clones de *A. occidentale*, foram inseridos como grupo externo.

3.2 Extração e quantificação de DNA

Folhas jovens foram coletadas no PNSC e armazenadas em solução saturada de CTAB-NaCl, e transportadas ao Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte. A extração do DNA foi realizada utilizando o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990) com adaptações a partir de 100 mg de tecido foliar. O material vegetal foi macerado em equipamento Precellys (6400 rpm, 2 X 25 s, intervalo de 30 s).

O DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose (0,8%) preparado em tampão TBE 0,5X (Tris-Borato-EDTA), corado com GelRed™ (Biotium) e fotografado sob luz ultravioleta.

A quantificação foi realizada por meio de comparação com DNA λ de concentração conhecida (100 ng/ μ l). A qualidade das amostras foi estimada por meio de espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). O DNA obtido foi armazenado em freezer, a -20°C, até a realização das reações de amplificação.

3.3 Reação em Cadeia da Polimerase

Foram selecionados 11 *primers* ISSR, desenvolvidos pela *University British of Columbia* (UBC), de acordo com o nível de polimorfismo e resolução das bandas. As características dos *primers* selecionados estão representadas na Tabela 2.

As reações de amplificação consistiram em volume final de 10 µl e nas seguintes concentrações: tampão 1X [20 mM Tris HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 50% (v/v) glicerol], MgCl₂ a 2,0 mM, 0,8 mM de dNTP, 0,8 µM de *primer*, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1 µl de DNA genômico (7 ng/µl) e 5,8 µl de água *MiliQ*.

Tabela 2 - Primers ISSR (UBC) usados na caracterização molecular de 58 acessos de *Anacardium ssp.*

<i>Primer</i>	T _m (C°)	T _a (C°)	Sequência 5'-3'	GC (%)
UBC 808	48,8	54,0	AGA GAG AGA GAG AGA GC	52,94
UBC 818	51,0	49,0	CAC ACA CAC ACA CAC AG	52,94
UBC 826	57,2	56,0	ACA CAC ACA CAC ACA CC	52,94
UBC 834	49,2	54,0	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	50,00
UBC 836	48,9	52,0	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	50,00
UBC 840	47,4	52,0	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	50,00
UBC 841	48,5	51,0	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	55,55
UBC 842	48,8	49,0	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	55,55
UBC 845	48,1	50,0	CTC TCT CTC TCT CTC TRG	55,55
UBC 857	54,3	55,0	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	55,55
UBC 864	43,6	50,0	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	33,33

T_m = Temperatura de *melting*. T_a = Temperatura de Anelamento. Y = C ou T; R = A ou G.

As reações foram conduzidas em termociclador Veriti™ 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) conforme 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 de acordo com a temperatura otimizada para cada *primer* por 45 segundos, extensão a 72 °C por 2 minutos; e uma extensão final a 72 °C durante 7 minutos.

Os fragmentos gerados por cada reação de amplificação foram separados em eletroforese em gel de agarose (1,5%) com TBE 0,5 X durante quatro horas a 100 V. Os géis foram corados com GelRed™ (Biotium) e fotodocumentados sob luz ultravioleta. Para facilitar a genotipagem dos dados, em cada gel foi aplicado dois marcadores de peso molecular conhecido, 1Kb (Invitrogen) e 100bp (Invitrogen).

3.4 Análises Estatísticas

A partir dos fragmentos amplificados, construiu-se uma matriz binária onde a presença e ausência da banda foram representadas, respectivamente, por 1 e 0. A matriz de dados foi então utilizada para a obtenção de uma matriz de similaridade por meio do coeficiente de Dice-Sorensen.

A partir da matriz de similaridade genética, construiu-se o dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Estimou-se ainda o índice de confiabilidade *bootstrap* com 1000 repetições e o coeficiente de correlação cofenética (r). Essas análises foram realizadas no programa PAST v. 3.08 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

Os parâmetros de diversidade genética foram estimados a partir do programa POPGENE v. 1.32 (YEH; YANG; BOYLE, 1999), foram eles: percentual de locos polimórficos, índice de diversidade de Nei (h) (NEI, 1987), índice de diversidade de Shannon (I) (LEWONTIN, 1972), coeficiente de diferenciação genética (G_{ST}) e número de migrantes (N_m) a partir da estimativa de G_{ST} . A distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações foi analisada por meio da análise de variância molecular (AMOVA) utilizando o programa ARLEQUIN v. 3.5.1.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010).

A análise de estruturação populacional foi realizada no programa Structure v. 2.3.4 (PRITCHARD, STEPHENS; DONNELLY, 2000). Adotou-se o modelo de mistura com frequências alélicas correlacionadas, de modo que foram realizadas 10 corridas independentes para cada valor de K , que variou de 1 a 7; com 1.000.000 de simulações em MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) e 500.000 gerações *burnin*. O K mais provável foi determinado através dos valores de ΔK conforme a metodologia de Evanno, Regnaut, Goudet (2005) obtidos no Structure Harvester v. 0.6.9 (EARL; VONHOLDT, 2012).

4 RESULTADOS

4.1 Similaridade Genética

A partir dos 11 *primers* selecionados obteve-se um total de 112 locos amplificados, dos quais 93 foram polimórficos, o que representa 83,04% de polimorfismo. O maior número de bandas foi obtido pelo *primer* UBC 834 (14), enquanto o menor pelos *primers* UBC 840 e UBC 845 (7); com média de 10,18 locos gerados por *primer*. O tamanho dos fragmentos variou de 150 a 2200 pb (Tabela 3).

O perfil de amplificação do *primer* 834 está representado na Figura 3.

Tabela 3 - Locos amplificados e polimorfismo gerado a partir de 11 *primers* ISSR.

<i>Primers</i>	Locos		Polimorfismo (%)	Amplitude das Bandas (pb)
	Total	Polimórficos		
808	11	10	90,9	300-1500
818	8	8	100	250-1550
826	12	11	91,7	400-2000
834	14	11	78,6	150-2000
836	12	9	75,0	200-1800
840	7	7	100	300-1500
841	10	8	80,0	500-2200
842	13	10	76,9	200-1650
845	7	6	85,7	500-1850
857	8	8	100	400-1300
864	10	5	50,0	250-1100
Total	112	93	83,04	150-2200

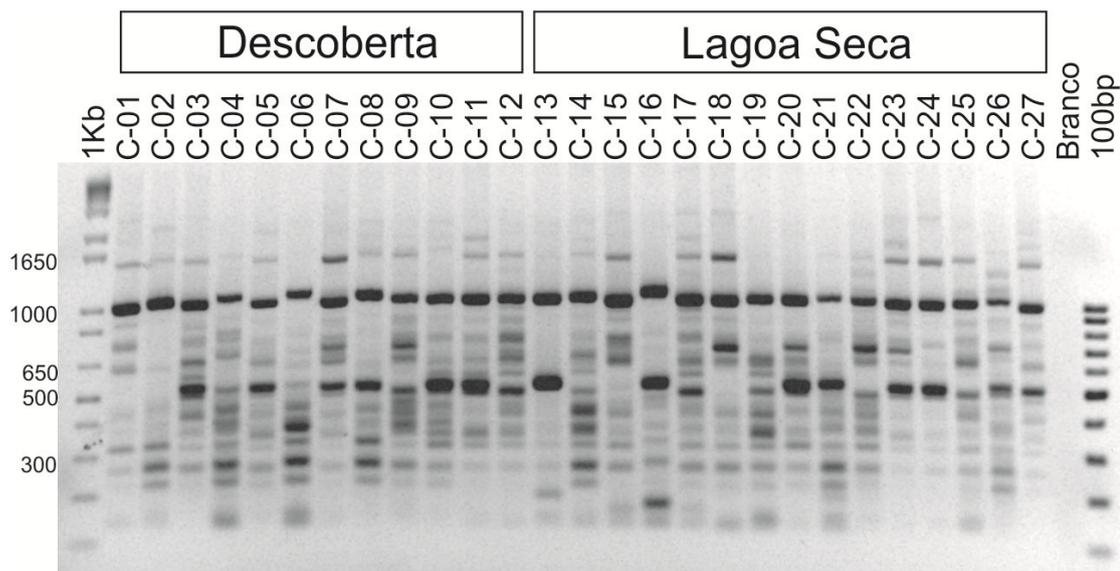


Figura 3 - Perfil eletroforético obtido a partir da amplificação do DNA de 27 acessos de cajuí do Parque Nacional de Sete Cidades distribuídos em duas populações, Descoberta (12) e Lagoa Seca (15) com o *primer* 834 (UBC). Branco – controle negativo.

As similaridades genéticas entre os indivíduos de *Anacardium* spp. variaram de 0,60, entre os acessos C-23 (População Lagoa Seca) e Caju-II (BAG), a 0,94 entre os acessos C-26 e C-27, ambos coletados no PNSC (População Lagoa Seca). A similaridade média calculada foi 0,81.

De modo geral, os menores valores de similaridades foram encontrados entre acessos de cajuí coletados no PNSC e os dois acessos de cajus. Os acessos mais divergentes em relação ao grupo externo foram: C-13, C-16, C-22, C-23 e C-44, de modo que a similaridade média foi, respectivamente, 0,63; 0,64; 0,65; 0,61; 0,63.

O valor de similaridade mais baixo encontrado dentro do PNSC foi entre os acessos C-22 e C-26 (0,675), ambos coletados na mesma localidade, Lagoa Seca. Além disso, o acesso C-22 foi o que se mostrou mais divergente dentro do PNSC, uma vez que os menores valores de similaridade foram encontrados entre este e os seguintes acessos, C-03 (0,693), C-05 (0,687), C-34 (0,693) e C-39 (0,693).

A partir da matriz de similaridade obteve-se o dendrograma pelo método UPGMA. O alto valor obtido da correlação cofenética (r) 0,83 mostra uma alta associação entre as similaridades obtidas pelo coeficiente de Dice-Sorensen e o dendrograma. Identificou-se a formação de dois grupos, utilizando como ponto de corte a mudança brusca no padrão de agrupamento sustentada por elevados valores de *bootstrap* (Figura 4).

O grupo I está representado pelos dois acessos de cajus e representam, portanto, o grupo externo. Todos os acessos coletados no PNSC reuniram-se no grupo II, de modo que não houve correlação com os locais de coleta. Percebe-se ainda, que o acesso C-22 é o mais divergente dentro do PNSC (Figura 4).

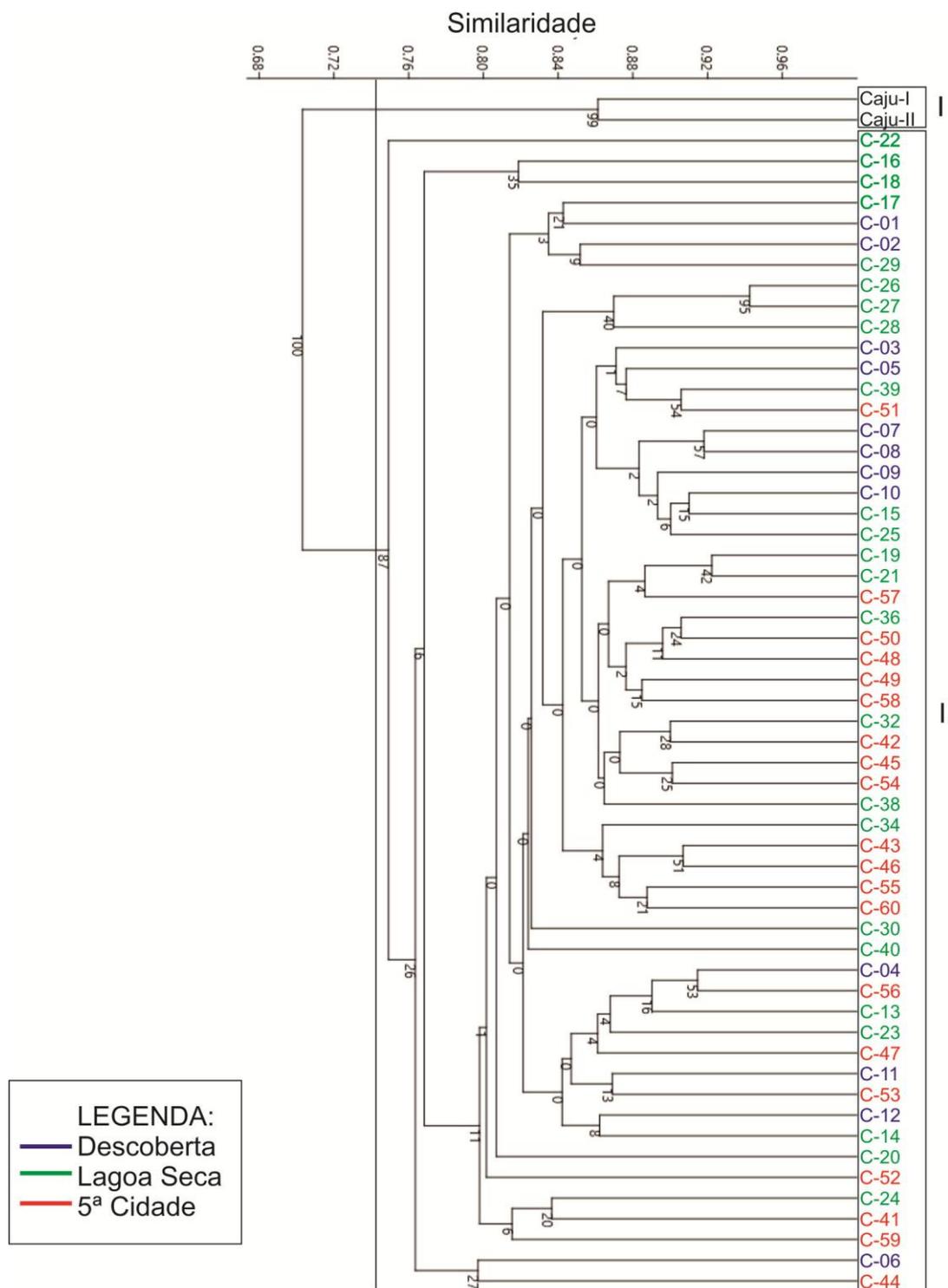


Figura 4 - Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA a partir do coeficiente de similaridade genética de Dice-Sorensen de 56 acessos de *Anacardium* spp. provenientes do PNSC (PI, Brasil) e 02 acessos de caju (grupo externo), obtido a partir de 112 locos, dos quais 93 foram polimórficos, produzidos por meio de 11 *primers* ISSR.

4.2 Diversidade Genética

O maior percentual de locos polimórficos foi encontrado na população Lagoa Seca (78,57%) e o menor na população Descoberta (61,61%). O índice de diversidade Nei (h) variou de 0,2227 a 0,2691. O índice de Shannon (I) oscilou de 0,3322 a 0,4026. Ao nível de todos os acessos, a média dos índices de diversidade genética foram $h = 0,2645$ e $I = 0,3930$ (Tabela 4).

Tabela 4 - Estimativas de diversidade genética, número de migrantes e diferenciação genética das três populações de *Anacardium* spp.

População	NLP	PLP (%)	h	I	Nm	G _{ST}
Descoberta	69	61,61	0,2227	0,3322		
Lagoa Seca	88	78,57	0,2691	0,4026		
5ª Cidade	81	72,32	0,2390	0,3620		
Todos os indivíduos	93	83,04	0,2645	0,3990		
Subpopulações					6,7028	0,0694

NLP = número de locos polimórficos; PLP = percentual de locos polimórficos; h = índice de diversidade de Nei, I = índice de diversidade de Shannon; Nm = número de migrantes; G_{ST} = índice de diferenciação genética entre populações.

O índice de diferenciação G_{ST} mostrou que apenas 6,94% da diversidade genética foi encontrada entre as populações. O valor de Nm indicou que há a ocorrência de seis migrantes a cada geração, indicando um elevado fluxo gênico entre as populações (Tabela 4).

4.3 Estrutura e Diferenciação Genética

Os resultados obtidos pela AMOVA revelaram que a maior parte da variabilidade genética encontra-se dentro das populações (96,17%) e que há pouca diferenciação entre as mesmas ($\Phi_{ST} = 0,03828$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise de Variância Molecular entre e dentro das três populações de *Anacardium* spp.

Fontes de Variação	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Componente de Variância	Percentual de Variação	Índice de Fixação (Φ_{ST})	Valor de P
Entre as Populações	2	50,455	0,58497	3,83	0,03828	0.00000
Dentro das Populações	53	778,992	14,69796	96,17		

Valor de P = probabilidade de significância.

Os resultados da análise Bayesiana executada no programa Structure indicam que os agrupamentos não estão fortemente correlacionados com as localizações geográficas, pois indivíduos de um mesmo ponto de coleta apresentaram grande probabilidade de pertencerem a mais de um grupo genético.

Os acessos de *Anacardium* spp. foram alocados em quatro grupos genéticos distintos, uma vez que o valor mais provável de ΔK foi $K=4$ (Figura 5).

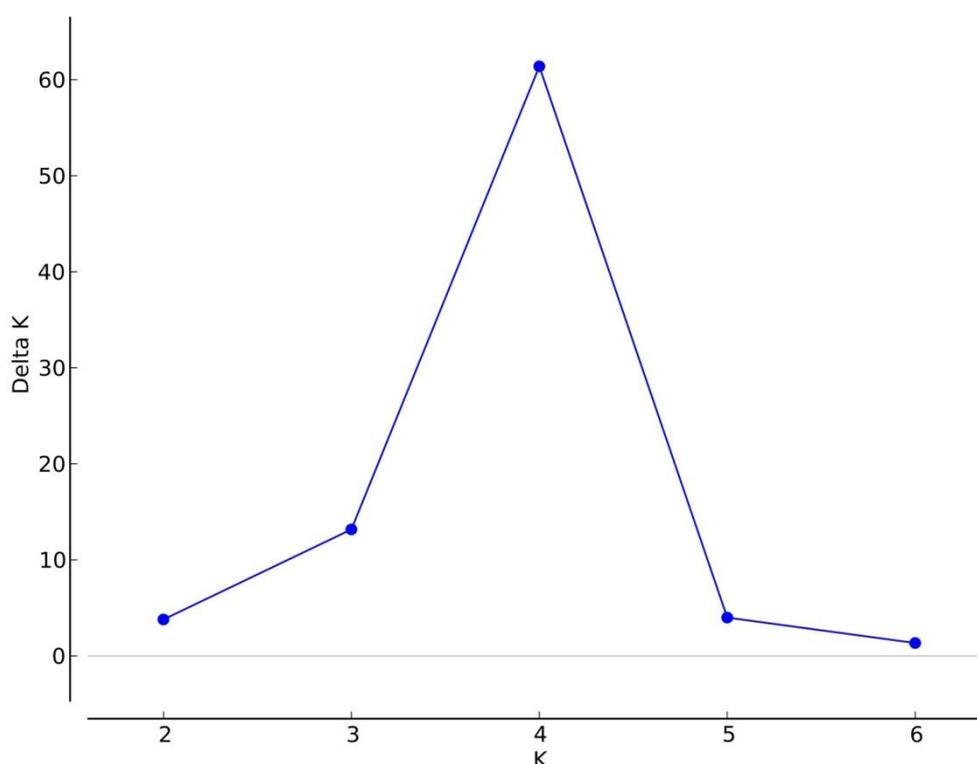


Figura 5 - Valores de ΔK estimados para as populações de *Anacardium* spp., conforme o proposto por Evanno; Regnaut e Goudet. (2005).

Todos os acessos foram constituídos pelos quatro grupos genéticos, em maior ou menor proporção (Figura 6). Embora o grupo genético que aparece em maior proporção na população Descoberta seja o representado pela cor azul (42%), na população Lagoa Seca o amarelo (31%) e na 5ª Cidade o verde (38%), não há uma predominância uma vez que nenhum deles representa mais do que 50%. Isso demonstra uma grande mistura de genomas entre os grupos genéticos.

Apenas os dois acessos de cajus apresentam predominância superior a 80% pelo grupo genético representado pela cor vermelha, tornando-os mais divergentes (Figura 6). Esses resultados estão de acordo com os obtidos pelo agrupamento UPGMA.

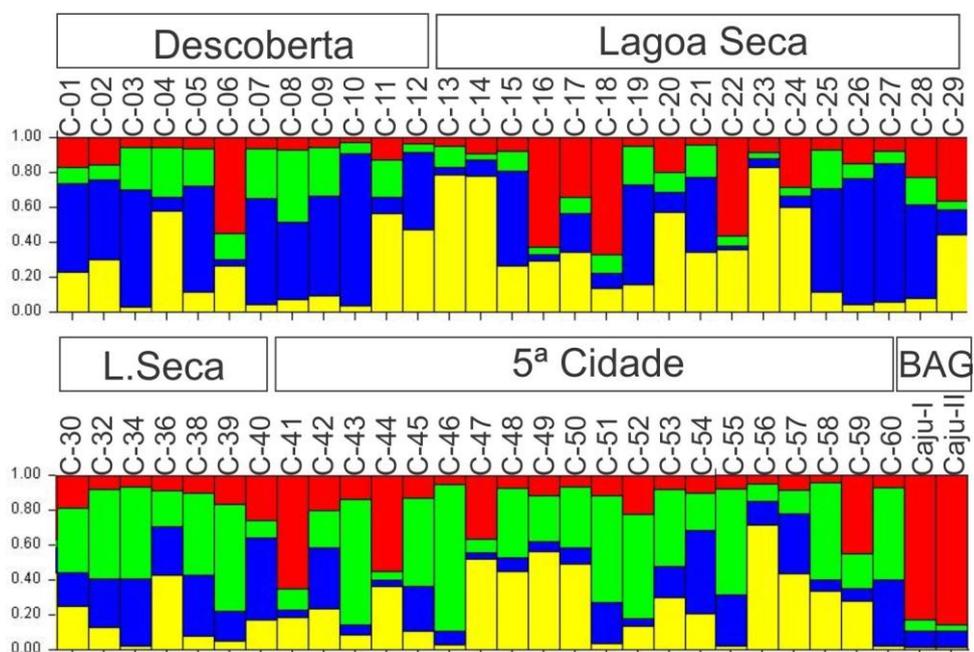


Figura 6 - Representação gráfica do Structure mostrando os acessos de *Anacardium* spp. distribuídos em quatro grupos genéticos.

5 DISCUSSÃO

O percentual de locos polimórficos é um parâmetro utilizado para avaliar a eficiência dos marcadores moleculares ao estimarem a variabilidade genética de populações (GRATIVOL et al., 2011). A partir dos 11 *primers* ISSR obteve-se um total de 112 locos, dos quais 93 (83,04%) foram polimórficos. Desse modo, os marcadores ISSR foram eficientes na caracterização e discriminação da diversidade genética dos acessos de *Anacardium* spp.

O polimorfismo detectado (83,04%), o número de locos por *primer* (8-14) e a amplitude (150-2200 pb) das bandas geradas nesse trabalho estão de acordo com os relatados na literatura para acessos de *Anacardium* com marcadores ISSR, onde a variação do percentual de polimorfismo foi de 86,4 a 89,65%, o número de locos por *primer* variou de 5 a 13 e a amplitude das bandas oscilou de 100-2500pb (DASMOHAPATRA, RATH E ROUT, 2013; DASMOHAPATRA et al., 2014).

Os acessos mais similares, C-26 e C-27 (94,0%), assim como os mais divergentes encontrados dentro do PNSC, C-22 e 26 (32,5%) pertencem ao mesmo ponto de coleta (População Lagoa Seca), desse modo a similaridade foi pouco influenciada pela distância geográfica. Além disso, os acessos C-34 e C-39, também divergentes em relação ao C-22, além de serem oriundos da mesma localidade, encontram-se na mesma fitofisionomia do Cerrado (Cerrado típico) sugerindo que a variação ambiental não influenciou significativamente na diversidade genética.

A similaridade genética entre os acessos variou de, no máximo, 0,94 (entre os acessos C-26 e C-27) a um mínimo de 0,60 (entre C-23 e Caju-II). Desse modo, a diversidade representada pela dissimilaridade ficou entre 6 a 40%. Considerando apenas os acessos do PNSC a amplitude da diversidade é menor (6-32,5%), o que indica pouca a moderada variabilidade genética entre os acessos. Isso, possivelmente, está relacionado ao pequeno número de genótipos fundadores dessas populações ou a relação de parentesco entre eles.

A moderada variabilidade genética é reforçada pelos estimadores de diversidade. O índice de diversidade de Nei (h) varia de 0 a 0,5 para marcadores dominantes, o valor encontrado foi 0,2645. Enquanto o índice de Shannon (I) obtido foi 0,3990, onde o valor máximo de I é 0,69.

Do mesmo modo como observado para outras espécies, o nível de diversidade variou de acordo com o tamanho das populações (SOUSA-SOBREIRA et al., 2015). A maior população examinada, Lagoa Seca (24 indivíduos), apresentou os maiores valores tanto para o índice de Nei ($h = 0,2691$) como para o índice de Shannon ($I = 0,4026$). Por outro lado, a população Descoberta (12 indivíduos) foi a que apresentou a menor diversidade genética ($h = 0,2227$, $I = 0,3322$), que possivelmente foi influenciada pelo menor tamanho amostral.

Desse modo, outro fator que provavelmente contribuiu com a moderada variabilidade encontrada foi o tamanho amostral, insuficiente para revelar uma maior variabilidade genética existente dentro do PNSC para as espécies de cajuí. Entretanto, é importante lembrar que a coleta em populações naturais nem sempre é uma tarefa fácil e depende da disponibilidade das plantas no ambiente.

A AMOVA permitiu inferir que a maior parte da variabilidade genética encontra-se dentro das populações (96,17%) e que há pouca diferenciação entre as mesmas. Esse resultado está em consonância com o sistema reprodutivo das espécies do gênero *Anacardium*, predominantemente alogâmico (ALIYU, 2008). Em plantas alógamas espera-se que a variação seja maior dentro das populações (HU et al., 2010).

Além disso, embora as inflorescências dessas espécies sejam constituídas por flores masculinas e hermafroditas, a autofecundação é um mecanismo que ocorre de forma limitada, o que também contribui com a redução da variabilidade genética entre as populações (ERADASAPPA; MOHANA, 2016).

O G_{ST} (0.0694) e o índice de fixação (0,03828), obtido pela AMOVA; foram próximos e representam moderada a pouca diferenciação genética entre as populações, indicando a presença de um intenso fluxo gênico que foi evidenciado pelo elevado número de migrantes ($Nm = 6,7028$) por geração.

O fluxo gênico entre populações pode afetar diretamente a distribuição da variação genética, pois representa a introdução de novos variantes alélicos que implicam na redução da diferenciação genética entre as populações (HAMRICK, 2012). Um migrante ou mais por geração é considerado o suficiente para evitar uma subestruturação populacional (SHEIDAI et al., 2016). Assim, o alto valor obtido de Nm (6,7028) explica a pouca diferenciação encontrada entre as populações de cajuí do PNSC.

A análise bayesiana obtida pelo Structure assim como o agrupamento pelo método UPGMA também evidenciam a grande mistura de genomas, demonstrando que os pontos de coleta dentro do PNSC não representam subpopulações estruturadas. Entretanto, fica evidente que há uma diferenciação entre as espécies de cajuí e o grupo externo, representado pelos dois acessos de caju (*A. occidentale*).

O padrão de cores na análise bayesiana mostra que todos os acessos são constituídos pelos quatro grupos genéticos. De modo que em 16 deles (27,6%) o grupo genético com maior proporção é inferior a 50%, o que evidencia a vinculação desses grupos pela intensa troca de alelos.

Um fator importante que favorece o fluxo gênico entre as espécies de *Anacardium* é a biologia floral da planta. A estrutura da flor hermafrodita é tal que os estames são curtos, de forma que não alcançam o único e longo pistilo existente; o que dificulta a autofecundação (ERADASAPPA; MOHANA, 2016).

Outro fator considerável é a maior produção de flores masculinas em relação às flores hermafroditas, detectado tanto para a espécie comercial *A. occidentale*, como para o cajueiro anão precoce e a espécie *A. giganteum*; o que favorece o sistema de reprodução por alogamia. Portanto, a biologia floral interfere diretamente no modo de polinização da planta, favorecendo a polinização cruzada em *Anacardium* (SOUSA et al., 2007; TAKEHANA et al., 2013).

As características da morfologia floral de *Anacardium*, que incluem os atrativos florais de oferta de néctar, grão de pólen, aroma agradável, mudança de coloração das flores, estrutura e tamanho da flor e quantidade de flores produzida, contribuem significativamente para atrair os polinizadores, sendo as abelhas as polinizadoras efetivas (ERADASAPPA; MOHANA, 2016; TAKEHANA et al., 2013).

A pequena distância entre as populações é outro fator que favorece o fluxo gênico. As abelhas, especialmente a *Apis mellifera* L., são os principais agentes dispersores de pólen de *Anacardium* e podem percorrer grandes distâncias em busca de alimentos florais (HAGLE et al., 2011). Uma vez que a distância entre as populações de cajuí dentro do PNSC não excede 7,6 Km, o fluxo gênico, muito provavelmente, foi intensificado pelo pólen carregado pelas abelhas presentes na região.

A dispersão pela semente também pode ser considerada, pois o fruto (a castanha) está associado ao pedúnculo carnoso e suculento que atrai pequenos animais, principalmente morcegos frugívoros que possuem a capacidade de dispersar o fruto a longas distâncias (GALINDO-GONZÁLEZ, 1998).

O pedúnculo também é uma fonte de alimento para papagaios e periquitos que são visitantes frequentes dos cajuzeiros do PNSC e, possivelmente, também atuam como agentes dispersores da semente.

O grande potencial de dispersão das espécies de *Anacardium* via polinizadores e dispersores de sementes, associados, respectivamente, à elevada viabilidade polínica, maior que 90% em duas espécies de cajuí (*A. microcarpum* e *A. pumilum*), e aos altos percentuais de germinação culminam em elevado fluxo gênico (ERADASAPA et al., 2014; ALVES et al., 2013; MOREIRA; SILVA; MEDEIROS-FILHO, 2016).

Além de todo o potencial econômico, medicinal e ecológico, as populações de *Anacardium* avaliadas no presente estudo encontram-se sob condições ambientais adversas, como por exemplo, seca e solo pouco nutritivo. Assim, uma vez que sobrevivem a essas condições, são acessos que podem conter genes responsáveis pela defesa da planta sob condições de estresse abiótico. Desse modo, sabendo que focos de incêndios são comuns dentro do PNSC, alelos com potencial a serem explorados por programas de melhoramento podem ser perdidos, o que torna necessário, portanto, a conservação *ex situ* desses materiais.

Uma etapa fundamental para promover estratégias de conservação dos recursos genéticos é o conhecimento da diversidade genética. Essa informação é essencial na formação de germoplasmas (SANTANA et al., 2016). Desse modo, visando à conservação *ex situ* desses materiais e ampliação do BAG da Embrapa Meio-Norte sugere-se a incorporação do grupo de acessos de cajuí mais divergentes analisados, são eles: C-03, C-05, C-22, C-26, C-34 e C-39.

6 CONCLUSÕES

Os marcadores moleculares ISSR foram eficientes na caracterização dos acessos de *Anacardium* spp. analisados e representam, portanto, uma ferramenta importante para o estudo da diversidade genética em cajuí.

As três populações estudadas apresentam moderada variabilidade genética, resultado de um pequeno tamanho amostral ou da constituição genética dos genótipos ancestrais. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de futuros estudos que envolvam uma maior amostragem, permitindo acessar com mais clareza a variabilidade existente entre a(s) espécie(s) de cajuí dentro do PNSC.

Os três pontos amostrados dentro do PNSC não constituem subpopulações, devido ao intenso fluxo gênico favorecido pelas características morfológicas e reprodutivas das flores de *Anacardium* spp., assim como também pelos polinizadores e pequenos animais, dispersores das sementes.

Os acessos mais divergentes geneticamente foram oriundos de duas populações, C-03, C-05 (Descoberta), C- 22, C-26, C-34, C-39 (Lagoa Seca) e são, portanto, os indicados à conservação *ex situ* e inclusão ao BAG do Cajuí da Embrapa Meio Norte.

7 REFERÊNCIAS

- ADHAIKARI, S.; SAHA, S.; BANDYOPADHYAY, T. K.; GHOSH, P. Efficiency of ISSR marker for characterization of *Cymbopogon germoplasms* and their suitability in molecular barcoding. **Plant Systematics and Evolution**, v. 301, n. 1, p. 439-450, 2014.
- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 4, p. 617-631, 2008.
- ALMEIDA, A. S. **Qualidade, compostos bioativos e atividade antioxidante total de pedúnculos de cajuzeiros e frutos de umbuzeiros nativos do semiárido do Piauí**. 2009. 178 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, 2009.
- ALVES, F. A. L.; PONTE, L. F. A.; FERREIRA-SILVA, S. L.; MAIA, J. M.; SILVEIRA, J. A. G. Germinação e estabelecimento de plântulas de cajueiro-anão precoce (*Anacardium occidentale* L.) em função da salinidade. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 8, n.2, p. 197-204, 2013.
- ALIYU, O. Compatibility and fruit-set in cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Euphytica**, v. 160, n. 1, p. 25-33, 2008.
- ARIGONI-BLANK, M. F.; SANTOS, M. S.; BLANK, A. F.; RABBANI, A. R. C.; SILVA-MANN, R.; SANTOS, J. B.; COSTA, A. S.; MENEZES, T. S. A. Analysis of genetic diversity of Laeliinae (Orchidaceae) in the State of Sergipe using ISSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, p. 1-9, 2016.
- BARBOSA FILHO, V. M.; WACZUK, E. P. KAMDEM, J. P.; ABOLAJI, A. O.; LACERDA, S. R.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. R. A.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; ROCHA, J. B. T.; POSSER, T. Phytochemical constituents, antioxidant activity, cytotoxicity and osmotic fragility effects of caju (*Anacardium microcarpum*). **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 280–288, 2014.
- BARROS, L. M.; CRISÓSTOMO, J. R. Melhoramento genético do cajueiro. In: ARAÚJO, J. P. P.; SILVA, V. V. Embrapa: Brasília. **Cajucultura, modernas técnicas de produção**. p. 73-96, 1995.
- BUHROO, Z. I.; GANAI, N. A.; BHAT, M. A. Molecular marker systems with special reference to the *Silkworm Bombyx mori* L. **International Journal of Bioassays**, v. 5, n. 11, p. 5025-5040, 2016.

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

CASTRO, A. A. J. F.; ARZABE, C.; CASTRO, N. M. C. F. **Biodiversidade e ecótonos da região setentrional do Piauí**. 1 ed. Teresina: EDUFPI, 2010.

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**. p. 143-162, 2010.

COSTA, M. F.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; ARAÚJO, A. S. F.; ZUCCHI, M. I.; PINHEIRO, J. B.; VALENTE, S. E. S. Caracterização e divergência genética de populações de *Casearia grandiflora* no cerrado piauiense. **Floresta e Ambiente**, v. 23, n. 3, p. 387-396, 2016.

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

DASMOHAPATRA, R.; RATH, S.; PRADHAN, B.; ROUT, G. R. Molecular and agromorphological assessment of cashew (*Anacardium occidentale* L.) genotypes of India. **Journal of Applied Horticulture**, v. 16, n.3, p. 215-221, 2014.

DASMOHAPATRA, R.; RATH, S.; ROUT, G. R. Analysis of genetic relationship in cashew (*Anacardium occidentale* L.) varieties using morphological characters and ISSR markers. **Journal of Plantation Crops**, v. 41, n. 3, p. 321-329, 2013.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.

ERADASAPPA, E.; MOHANA, G. S. Role of pollination in improving productivity of cashew – A review. **Agricultural Reviews**, v. 37, n. 1, p. 61-65, 2016.
ERADASAPPA, E.; MOHANA, G. S.; THIMMAPPAIAH; SAROJ, P. L. Pollen fertility in cultivated and wild species of cashew. **Journal of Plantation Crops**, v. 42, n. 2, p. 268-271, 2014.

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. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FERREIRA, M. B. Frutos comestíveis do DF (II): gabiobas, araçás, amoreira e cajus. **Cerrado**, v. 05, n. 19, p. 25-29, 1973.

FONSECA, C. M.; BOARI, C. A.; DOMINGUES, P. H. F.; MEIRA, D. P.; FERNANDES, L. S. F.; DUMONT, M. A. Iogurte produzido com cajuí (*Anacardium othonianum* Rizz). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 1829-1836, 2014.

GALINDO-GONZÁLEZ, J. Dispersion de semillas por murcielagos: su importancia en la conservation y regeneracion Del Bosque Tropical. **Acta Zoologie Mexico**, v. 73, p. 54-57, 1998.

GHORBEL, M.; MARGHALI, S.; TRIFI-FARAH, N.; CHTOUROU-GHORBEL, N. Phylogeny of Mediterranean *Lathyrus* species using inter simple sequence repeats markers. **Acta Botanica Gallica: Botany Letters**, v. 161, n. 1, p. 91-98, 2014.

GOMES, J. G.; OLIVEIRA, N. C.; NASCIMENTO, P. S. N.; PEREIRA, M. B. Componentes Principais no estudo da diversidade de cajuí na Sub-bacia do Rio dos Cochos. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, n. 2, p. 1-5, 2011.

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

GRATIVOL, C.; MEDEIROS, C. F. L.; HEMERLY, A. S.; FERREIRA, P. C. G. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. **Molecular Biology Reports**, v. 38, p. 4245-4256, 2011.

GROVER, A.; SHARMA, P. C. Development and use of molecular markers: past and presente. **Critical Reviews Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 290-302, 2014.

HAGLE, J. R.; MUELLER, S.; TEUBER, L. R.; MACHTLY, S. A.; DENYNZE, A. V. Foraging range of honey bees, *Apis mellifera*, in alfalfa seed production fields. **Journal of Insect Science**, v. 11, n. 144, p. 1-12, 2011.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.

HAMRICK, J. L. Gene movement in tropical tree populations – Tropical breeding systems: one and done? **Heredity**, v. 109, n. 6, p. 330-331, 2012.

HU, Y.; WANG, L.; XIE, X.; YANG, J.; LI, Y.; ZHANG, H. Genetic diversity of wild populations of *Rheum tanguticum* endemic to China as revealed by ISSR analysis. **Biochemical Systematics Ecology**, v. 38, p. 264-274, 2010.

JIANG, G. L. Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. In: ANDERSEN, S. B. **Plant Breeding from Laboratories to Fields**. InTech, p. 45-83, 2013.

KUMAR, P., GUPTA, V. K., MISRA, A. K., D. R. MODI, D. R.; PANDEY, B. K. Potential of molecular markers in plant biotechnology. **Plant Omics**, v. 2, n. 4, p.141-162, 2009.

LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, v. 6, p. 381-398, 1972.

LIEW, K. S.; HO, W. S.; PANG, S. L. Development and characterization of microsatellite markers in sawih tree (*Duabanga moluccana* Blume) using ISSR-suppression PCR techniques. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 21, n. 1, p. 163-165, 2015.

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

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

MOREIRA, F. J. C.; SILVA, M. A. P.; MEDEIROS-FILHO, S. Germinação e crescimento inicial de cajuí (*Anacardium microcarpum* DUCKE) em função do tamanho da semente e do tempo de embebição. **Caderno de Cultura e Ciência**, v. 15, n. 1, p. 19-28, 2016.

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University Press, New York, 1987.

NG, W. L.; TAN, S. G. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: are we doing it right?. **ASM Science Journal**, v. 9, n. 1, p. 30-39, 2015.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, E. R. Frutas nativas do Tocantins com potencial de aproveitamento economic. **Agri-Environmental Sciences**, v. 1, n. 1, p. 22-27, 2015.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

PRIYONO; PUTRANTO, R. A. Molecular markers and their application for DNA fingerprinting and genetic diversity studies in *Coffea* species. **E-Journal Menara Perkebunan**, v. 82, n. 1, p. 39-50, 2014.

QUEZADA, M.; PASTINA, M. M.; RAVEST, G.; SILVA, P.; VIGNALE, B.; CABRERA, D.; HINRICHSEN, P.; GARCIA, A. A. F.; PRITSCH, C. A first genetic map of *Acca sellowiana* based on ISSR, AFLP and SSR markers. **Scientia Horticulturae**, v. 169, p. 138-146, 2014.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. **Genética na Agropecuária**. 5 ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2012.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, n. 1, p. 9-17, 2002.

ROCHA, M. S.; FIGUEIREDO, R. W.; ARAÚJO, M. A. M.; ARAÚJO, R. S. R. M. Caracterização Físico-Química e atividade antioxidante (*in vitro*) de frutos do cerrado piauiense. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 3, n. 4, p. 933-941, 2013.

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

RUFINO, M. S. M.; CORRÊA, M. P. F.; ALVES, R. E.; LEITE, L. A. S.; SANTOS, F. J. 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.

SANTANA, J. G. S.; NASCIMENTO, A. L. S.; COSTA, T. S.; ALMEIDA, T. M. B.; RABBANI, A. R. C.; SILVA, A. V. C. Estimation of genetic diversity in a natural population of Cambuí tree (*Myrciaria tenella* O. Berg) using ISSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, p. 1-11, 2016.

SHEIDAI, M.; MOSAFERI, S.; KESHAVARZI, M.; NOORMOHAMMADI, Z.; BARAKI, S. G. Genetic diversity in different populations of *Persicaria minor* (Polygonaceae), a medicinal plant. **Nucleus**, v. 59, n. 2, p. 115-121, 2016.

SHOBHA, D.; THIMMAPPAIAH; JOSE, C. T. Molecular characterization and association analysis in caashew using RAPD and ISSR markers. **Journal of Plantation Crops**, v. 41, n. 3, p. 292-299, 2013.

SILVA, A. M. L.; MARTINS, B. A.; DEUS, T. N. Avaliação do teor de ácido ascórbico em frutos do cerrado durante o amadurecimento e congelamento. **Estudos**, v. 36, n. 6, p. 1159-1169, 2009.

SILVA, M. R.; LACERDA, D. B. C. L.; SANTOS, G. G.; MARTINS, D. M. O. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1790-1793, 2008.

SINGH, A.; SENGAR, R. S. DNA fingerprinting based decoding of indica Rice (*Oryza sativa* L.) via molecular marker (SSR, ISSR & RAPD) in aerobic condition. **Advances in Crop Science and Technology**, v. 3, n. 2, p. 1-8, 2015.

SOUSA, L. B.; FEITOZA, L. L.; GOMES, R. L. F.; LOPES, A. C. A.; SOARES, E. B.; SILVA, E. M. P. Aspectos de biologia floral de cajueiros anão precoce e comum. **Ciência Rural**, v. 37, n.3, p. 882-885, 2007.

SOUZA, P. L. C.; SILVA, M. R. Quality of granola prepared with dried caju-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz) and baru almonds (*Dipteryx alata* Vog). **Journal Food Science and Technology**, v. 52, n. 3, p. 1712-1717, 2015.

SOUZA-SOBREIRA, F. B.; SOUZA, G. B.; ROSADO, C. C. G.; MIRANDA, F. D.; SOARES, T. C. B.; GONTIJO, A. B. P. L. Genetic diversity in three natural populations of *Pitcairnia flammaea* (L.) John (Bromeliaceae) estimated by ISSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 15892-15901, 2015.

SOUZA, L. I.; CRESPO, M. F. V. O agroextrativismo como proposta de geração de renda, segurança alimentar e conservação ambiental na Ilha Grande de Santa Isabel/PI. **Cadernos de Agroecologia**, v. 10, n. 3, p. 1-6, 2015.

TAKEHANA, C. L. I. OHASHI, S. T.; JARDIM, M. A. G.; SANTOS, J. U. M. Biologia Floral e visitantes florais de *Anacardium giganteum* W. Hancock ex. Engl. (Anacardiaceae) no município de Bragança, Pará. **Revista de Ciências Agrárias**, v.6, n.3, p. 202-211, 2013.

TIWARI, J. K.; POONAM, P.; SAURABH, S.; DEVI, S.; ALI, N.; BHARDWAJ, V.; SINGH, B. P. Molecular characterization of potato somatic hybrids by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Potato Journal**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2015.

VELEZ, P.; QUINTERO, C. A.; MERINO, G.; GASCA-PINEDA, J.; GONZÁLEZ, M. C. An ISSR-based approach to assess genetic diversity in the marine arenicolous fungus *Corollospora maritime* sensu lato. **Mycoscience**, v. 57, p. 187-195, 2016.

VIJAYAN, K. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Polymorphism and Its Application in Mulberry Genome Analysis. **International Journal of Industrial Entomology**, v.10, n. 2, p.79-86, 2005.

YEH, F.; YANG, R.; BOYLE, T. **Microsoft window-based freeware for population genetic analysis**. Canada: University of Alberta, 1999.