



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**DIVERSIDADE GENÉTICA ESTIMADA COM MARCADORES ISSR EM
POPULAÇÃO NATURAL DE CAMBUZEIRO (*Myrciaria tenella* O. Berg)**

JOSEFA GRASIELA SILVA SANTANA

2016



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

JOSEFA GRASIELA SILVA SANTANA

**DIVERSIDADE GENÉTICA ESTIMADA COM MARCADORES ISSR EM
POPULAÇÃO NATURAL DE CAMBUIZEIRO (*Myrciaria tenella* O. Berg)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

Orientadora
Prof. Dr^a. Ana Veruska Cruz da Silva

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2016

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S232d	Santana, Josefa Grasiela Silva Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em população natural de cambuizeiro (<i>Myrciariatenella</i> O. Berg) / Josefa Grasiela Silva Santana ; orientador Ana Veruska Cruz da Silva. – São Cristóvão, 2016. 23 f. : il. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal de Sergipe, 2016.
1. Agricultura. 2. Myrtacea. 3. Germoplasma vegetal - Recursos. I. Silva, Ana Veruska Cruz da, orient. II. Título. CDU 631:582.776.2	

JOSEFA GRASIELA SILVA SANTANA

**DIVERSIDADE GENÉTICA ESTIMADA COM MARCADORES ISSR EM
POPULAÇÃO NATURAL DE CAMBUIZEIRO (*Myrciaria tenella* O. Berg)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

APROVADA em 25 de Fevereiro de 2016.

Dr. Ricardo Elesbão Aleves
Embrapa Agroindústria Tropical

Profa. Dr^a. Maria de Fátima Arrigoni Blank
UFS/PPGAGRI

Prof. Dr^a. Ana Veruska Cruz da Silva
Embrapa Tabuleiros Costeiros/UFS
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

A minha mãe Edna minha maior riqueza.
Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser a razão da minha vida. Aquele que guia meus caminhos, resgatando-me a cada dia quando tudo às vezes parece ruim, restaurando nesses momentos a minha fé, em muitos momentos de solidão trazendo paz ao meu coração. Com Ele busquei discernimento para tomar as decisões mais difíceis.

Ao meu pai Gabriel que mesmo sem mensurar os ganhos que o futuro me permitiria ter, sempre me proporcionou condições para realização dos meus mais variados desejos quanto à minha formação. O seu apoio foi fundamental na concretização desta etapa.

À minha mãe Edna, pelo exemplo de serenidade e fé, por ser tão motivadora e amiga, por ser a pessoa que mais me apoia e aquela que mais acredita na minha capacidade, que sempre esteve presente nos momentos de alegria como também nos de tristeza quando escutou cada desabafo e me consolou da maneira mais terna possível, pelo apoio financeiro mesmo quando não tinha de onde prover, sem nenhuma dúvida foi quem me deu o maior incentivo para conseguir concluir meu trabalho.

Aos meus irmãos Kiko, Áurea e Jaqueline pela paciência em me aturar e pela torcida, e a minha pequena estrela Anne Beatriz por ter me dado inúmeras alegrias desde seu nascimento. Aos demais familiares que sempre torceram para meu sucesso.

Aos meus grandes amigos Clarissa, Dalyanne, Diego, Mirlene e Tatiana, pelo carinho e pela compreensão nos momentos em que a dedicação aos estudos foi exclusiva e que o meu estresse me afastou do convívio com todos.

Ao meu querido João pela companhia, pelos elogios incentivadores que fizeram parte da minha busca por novos horizontes, em muitos momentos você me salvou da tristeza.

Aos amigos UFS, pela amizade que construímos em particular aqueles que estavam ao meu lado. Edie, pela generosidade ao dividir conhecimentos; Mayra, pela doçura em todas as palavras; Priscilla, pela agradável companhia, pela generosidade, pelo exemplo de determinação; Patrícia, por sua companhia inestimável, pela parceria em momentos muito divertidos e de identificação singular; e Paulo, pela ternura, por todos os momentos que passamos juntos. Meu especial agradecimento a vocês.

Gostaria de deixar expresso o meu eterno agradecimento à minha orientadora Dr^a Ana Veruska pela amizade, sensibilidade, paciência, alegria, pela oportunidade sempre concedida, pelo apoio e incentivo no desenvolvimento deste trabalho e na escrita desta dissertação, contribuindo de forma incontestável para minha capacitação profissional.

À toda equipe do laboratório de Biologia Molecular durante esses anos de 2014 a 2016: Hallana, Ariane, Trícia, Danielle, Ciro, Fabiany, Tanísia, Letícia, Camilla, Rosana, Silvio, Marina, Marília e Adrielle. Nos momentos mais estressantes vocês me proporcionaram as mais espontâneas gargalhadas acompanhadas sempre de um copo de café.

À Dr^a Tatiana Costa, amiga inestimável que proporcionou meu crescimento técnico nos mínimos detalhes e fez com que eu descobrisse como é valiosa essa árdua e gratificante fase de aprendizado no Mestrado. Serei infinitamente grata por tudo!

À Dr^a Allívia Rouse pelas amizade e contribuições técnicas.

Aos queridos amigos incentivadores Dr^o Leandro Diniz e Dr^o Pedro Viégas por apontar o melhor caminho a seguir me ajudando na escolha do Doutorado.

Aos funcionários da Embrapa, especialmente ao Sr. Erivaldo e toda equipe do Campo Experimental da Embrapa em Itaporanga D'Ajuda.

À UFS e a Embrapa Tabuleiros Costeiros por disponibilizar o espaço físico, recursos humanos e a estrutura técnica dos seus laboratórios para a realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido através da bolsa durante o período do Mestrado.

À todos os professores do curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, pela paciência, dedicação e ensinamentos disponibilizados nas aulas. Aos colegas de curso pelos momentos compartilhados.

À todos que contribuíram de diferentes maneiras para que esse trabalho fosse concluído meu sincero AGRADECIMENTO.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1. Aspectos Gerais (Myrtaceae)	2
2.2. Recursos genéticos	2
2.3. Marcadores moleculares.....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	5
3.1. Material Vegetal.....	5
3.2. Extração de DNA	6
3.3. Eletroforese, quantificação do DNA e diluição	7
3.4. Teste e seleção de <i>primers</i> ISSR.....	7
3.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese e documentação.....	8
3.6. Identificação do número ótimo de bandas.....	9
3.7. Análise dos dados.....	9
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
4.1. Análise ISSR	9
4.2. Número ótimo de bandas.....	10
4.3. Diversidade genética	12
5. CONCLUSÕES	17
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	População natural de cambuizeiro. Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN), Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2016	5
2	Localização do Campo Experimental de Itaporanga D'Ajuda e da Sede da Embrapa Tabuleiros Costeiros	6
3	Visualização do DNA de cambuizeiro. (A) e (B) referente à extração das amostras 1 a 30 (C) referente à extração das amostras 15, 16 e 31 a 50	7
4	Coeficiente de variação (CV%) em função do número de fragmentos em 50 indivíduos de cambuizeiro (<i>Myrciaria tenella</i> O. Berg), com base nas similaridades genéticas obtidas pelo método de <i>bootstrap</i> com 5.000 reamostragens	11
5	Representação filogenética do agrupamento UPGMA estimado a partir da similaridade genética do coeficiente de Jaccard (1908), e análise Bootstrap (10.000x) para 50 indivíduos da população de cambuizeiro (<i>Myrciaria tenella</i> O. Berg)	12
6	Análise de Coordenadas Principais (ACoP) entre 50 indivíduos da população de cambuizeiro (<i>Myrciaria tenella</i> O. Berg)	17

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 <i>Primers</i> ISSR, respectivas sequências e temperaturas de anelamento.....	9
2 Relação dos primers ISSR, número de total de bandas, porcentagem de polimorfismo e amplitude de bases, gerados pelas reações de PCR para estudo da diversidade genética entre indivíduos de população de cambuizeiro (<i>Myrciaria tenella</i> O. Berg)	12
3 Número de alelos (Na); Número efetivo de alelos (Ne); Índice de Shannon (I) e Diversidade genética (H) em estudo da diversidade genética de população de cambuizeiro (<i>Myrciaria tenella</i> O. Berg), utilizando marcadores ISSR	14
4 Matriz da similaridade genética do coeficiente de Jaccard (1908) obtida utilizando 10 iniciadores de síntese (<i>primers</i>) pela técnica PCR entre 50 indivíduos de população de cambuizeiro (<i>Myrciaria tenella</i> O. Berg)	15

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados
BAG	Banco Ativo de Germoplasma
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
CV%	Coeficiente de Variação
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
He	Heterozigosidade Esperada
I	Índice de Shannon
ISSR	Sequências Simples Repetidas Internas
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Na	Número de alelos
NE	Número de alelos efetivos
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
ACoP	Análise de Coordenadas Principais
RAPD	Polimorfismo de DNA amplificados ao acaso
RFLP	Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
RNAse	Ribonuclease
TE	Tris-HCl 10 mM, pH. 8,0; EDTA 1mM

RESUMO

SANTANA, Josefa Grasiela Silva. **Diversidade Genética estimada com marcadores ISSR em população natural de cambuizeiro (*Myrciaria tenella* O. Berg).** São Cristóvão: UFS, 2016. 23p. (Dissertação – Mestrado em Agricultura e Biodiversidade). *

Pertencente à família Myrtaceae, o cambuizeiro (*Myrciaria tenella* O. Berg) é uma espécie nativa do Brasil. A caracterização molecular é uma das ferramentas biotecnológicas mais utilizadas para estudos de espécies potenciais, uma vez que possibilitam inferir sobre o nível de diversidade entre os indivíduos. A análise da diversidade genética é fundamental para o direcionamento das estratégias necessárias para formação e manutenção de um germoplasma. Este trabalho teve como finalidade avaliar a diversidade genética em uma população natural de cambuizeiro utilizando marcadores moleculares ISSR. A população natural provedora do material vegetal utilizado encontra-se na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) do Caju, pertencente ao Campo Experimental da Embrapa Tabuleiros Costeiros, no município de Itaporanga d'Ajuda, SE. Folhas jovens de cada indivíduo foram coletas para a extração de DNA e análises de PCR-ISSR (Sequência Simples Repetitivas Internas). Foram testados 30 iniciadores de síntese (primers), selecionando-se os 10 melhores. O uso desses primers resultaram em 71 fragmentos, com 98,3% de polimorfismo. A similaridade dos indivíduos variou entre 0,30 e 0,92, sendo os mais similares os indivíduos C13 e C17 e mais distantes os C1 e C41. Por meio do agrupamento UPGMA foi possível identificar seis grupos distintos. As informações obtidas serão utilizadas para conservação desses recursos genéticos, direcionar um intercâmbio de germoplasma e/ou formação de coleções *ex situ* e auxiliar em futuros trabalhos com a espécie.

Palavras-chave: Myrtaceae, frutas nativas, recursos genéticos.

* Comitê Orientador: Ana Veruska Cruz da Silva – UFS (Orientadora).

ABSTRACT

SANTANA, Josefa Grasiela Silva. **Genetic diversity in natural population of cambui (*Myrciaria tenella* O. Berg) using ISSR markers.** São Cristóvão: UFS, 2016. 23p. (Thesis - Master of Science in Agriculture and Biodiversity).*

Belonging to the Myrtaceae family, cambui tree (*Myrciaria tenella* O. Berg) is native of Brazil. The Molecular characterization is one of the most used tools for potential species because infers about level of diversity between individuals. Analysis of genetic diversity are critical to the direction of the strategies needed to build and maintain a germplasm. The objective of this work was to estimate the genetic diversity in a natural population of cambui using molecular markers ISSR. The provider of plant material used is a natural population, in Private Natural Heritage Reserve (RPPN) in part of the Experimental Field of Embrapa Coastal Tablelands, in the municipality of Itaporanga d'Ajuda, SE. Young leaves of each individual were collected for ADN extraction and analysis of PCR-ISSR (Simple Sequence Repetitive Internal). Were tested 30 primers and selected 10 for the analysis. The use of these primers resulted in 71 fragments with 98.3% of polymorphism. The similarity of the individuals ranged between 0.30 and 0.92, with the most similar C17 and C13 and more distant, C1 and C41. Through UPGMA was possible to identify six distinct groups. The information obtained will be used for conservation of these genetic resources, direct exchange of germplasm and / or training of ex situ collections and assist in future work with the species.

Key-words: Myrtaceae, native fruits, genetic resources.

* Supervising Committee: Ana Veruska Cruz da Silva – UFS.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se por abrigar entre 15% e 20% de toda biodiversidade mundial e apresenta o maior número de espécies endêmicas, sendo que grande parte destas concentram-se na Amazônia, e em dois dos dezenove *Hotspots*¹ mundiais (a Mata Atlântica e o Cerrado) (GANEM, 2010). Embora seja de suma importância para a manutenção dos processos ecológicos naturais e para as atividades humanas, estimativas recentes evidenciam uma relevante queda na biodiversidade e sugerem que espécies desaparecidas estarão concentradas nos hotspots onde a ameaça ao habitat é maior (JOPPA et al., 2011).

Em nível mundial, espécies de Myrtaceae são encontradas em quase todos os continentes e abrangem mais de 140 gêneros e 5800 espécies de árvores e arbustos (GOVAERTS, et al., 2008). No Brasil, principalmente em regiões onde há predominância de Mata Atlântica, as árvores da família Myrtaceae destacam-se como as lenhosas de maior importância biológica, uma vez que são predominantes na composição deste bioma (GUILHERME et al., 2004; GRESSLER et al., 2006). Entretanto, em detrimento ao aumento substancial do desmatamento, da expansão das fronteiras agrícolas e pecuárias, da exploração de plantas arbóreas e do crescimento humano, ocorre gradualmente a fragmentação dos ecossistemas, limitando-se a pequenas manchas ou fragmentos isolados a substituição da cobertura florestal. Com isso, as espécies endêmicas do bioma Mata Atlântica estão desaparecendo rapidamente (MORELLATO e HADDAD, 2000).

Em Sergipe, a cobertura florestal de Mata Atlântica ocupa atualmente 7,47% de sua área original (JESUS et al., 2014). Várias frutíferas nativas têm alto potencial de uso e alguns estudos foram realizadas em Sergipe sobre elas (MELO, 2005; COSTA et al., 2011; RABBANI et al., 2012).

Existe um grande número de plantas nativas que estão desaparecendo sem ao menos terem sido avaliadas quanto aos conhecimentos básicos, como é o caso de alguns exemplos da família Myrtaceae, que estão inclusas em listas de espécies ameaçadas de risco de extinção no Brasil (LANDRUM e KAWASAKI, 1997; MACHADO, 2005). Portanto, é de vital importância que existam estratégias de conservação destes recursos, requerendo para tal investigações sobre ecologia, genética, reprodução, fisiologia, biogeografia, botânica e antropologia (PÁDUA e FERREIRA, 2008).

Dentre as frutíferas nativas do Brasil, o cambuizeiro (*Myrciaria tenella* O. Berg), pertencente à família Myrtaceae é uma frutífera nativa pouco difundida, encontrando-se quase que totalmente em áreas naturais de forma extrativista. Apresenta potenciais ainda não explorados, podendo constituir fonte de alimentos e de diversos compostos (PINHEIRO et al., 2011). Apesar de Lorenzi (2000) sugerir a espécie como potencial para uso paisagístico e madeireiro, sua produção ainda não é difundida. Diferentemente, há outras mirtáceas que possuem alto valor econômico, como a goiabeira (*Psidium guajava* L.) e algumas outras mais estudadas como a jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg.) e a pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), que são exploradas comercialmente (LANDRUM e KAWASAKI, 1997).

A conservação dos recursos genéticos vegetais é uma tarefa complexa e multidisciplinar, que envolve diversas etapas como a obtenção do germoplasma, caracterização, avaliação, documentação, conservação propriamente dita e a utilização dos recursos genéticos (PÁDUA e FERREIRA, 2008).

Um dos meios utilizados para promover a conservação dos recursos genéticos é a avaliação da diversidade genética, que nos permite conhecer e avaliar sobre o grau de variabilidade genética, fundamental no processo de formação de germoplasma e de identificação de novos genes de interesse. Dessa maneira o uso de marcadores moleculares

¹ *Hotspot*: bioma que conjuga alto índice de espécies endêmicas com alto grau de ameaça pela atividade humana

tem sido uma ferramenta biotecnológica muito utilizada por fornecer informações ao nível do DNA.

Sendo assim, este trabalho teve como finalidade avaliar a diversidade genética em uma população natural de cambuízeiro utilizando marcadores moleculares ISSR.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Aspetos Gerais (Myrtaceae)

Myrtaceae é uma grande família de plantas lenhosas dicotiledóneas que compreende cerca de 5800 espécies organizadas em aproximadamente 140 gêneros (GOVAERTS et al., 2008). Considerada uma das famílias mais importantes dos neotrópicos (DUARTE, 2003) e compreende vários gêneros de relevância econômica e ecológica em todo mundo. Sua ocorrência tem sido descrita essencialmente no hemisfério sul, tem centros de diversidade nos trópicos úmidos, especialmente na América do Sul, Austrália e Ásia tropical com ocorrências na África e na Europa (GRATTAPLAGIA et al., 2012). Representa uma das maiores famílias da flora brasileira, com 26 gêneros e aproximadamente 1000 espécies (SOUZA, 2008); destacando-se os gêneros *Eugenia*, *Campomanesia*, *Psidium* e *Myrciaria*, pois agregam o maior número de espécies de interesse econômico no Brasil.

Esta família é caracterizada pela combinação de diferentes fatores, como a presença de glândulas oleíferas em árvores ou arbustos; folhas inteiras, simples, geralmente opostas, normalmente com nervura marginal; flores hermafroditas geralmente brancas, sépalas e pétalas 4-5(6) livres, polistêmones, raro diplostêmones, ovário ínfero; bagas ou drupas com uma a numerosas sementes (PROENÇA et al., 2013). A polinização é via de regra por insetos e a dispersão por vertebrados (GRESSLER, 2005).

O cambuízeiro (*Myrciaria tenella* O. Berg) é uma mirtácea, nativa do Brasil, de ocorrência desde o norte ao sul do Brasil e estende-se até a Argentina (SOBRAL et al., 2010). Os frutos são bagas globosas, glabras e brilhantes, de cor que variam de roxo à laranja (PINHEIRO et al. 2011), contendo uma ou duas sementes. O florescimento ocorre nos meses de novembro-dezembro, produzindo frutos que amadurecem de janeiro a março (LORENZI, 2000).

Os frutos apresentam alto potencial devido aos atributos relativos ao conteúdo de vitamina C, em torno de 70,21 mg. 100⁻¹MF (PINHEIRO et al., 2011). Também demonstram alto potencial em estudos na produção de suco, geleia e fermentado com propriedades antioxidante e de concentrações de antocianinas e polifenóis onde foram mostraram valores superiores aos encontrados em suco de uva e vinhos de uvas tintas (BIASOTO et al., 2011; RYBKA et al., 2011). Além disso, são ricas fontes em polissacarídeos, podendo ser potencialmente utilizados por suas propriedades de gelificação (ROLIN, 1993; VRIESMANN et al, 2004) ou por seus benefícios à saúde humana auxiliando na redução de LDL e níveis de colesterol totais no sangue (BAKER, 1994).

É uma espécie importante no setor de fruticultura no mercado regional no estado de Sergipe, onde a população tem vendido seus frutos frescos para consumo (SILVA et al., 2012).

2.2. Recursos genéticos

O ritmo da perda da biodiversidade é provavelmente bem mais acelerado que o ritmo da descoberta e identificação de novas espécies pela ciência (SCHEFFERS et al., 2012). Estudos recentes têm esclarecido onde as espécies mais vulneráveis vivem, onde e como a humanidade muda o planeta, e como isso impulsiona extinções. As atuais taxas de extinção

são cerca de 1000 vezes a taxas anteriores e provavelmente ainda estão subestimadas (PIMM et al., 2014).

A intensa erosão genética e extinção de espécies tem decorrido de elementos desencadeadores através de atividades antrópicas: a destruição de habitats, introdução de espécies exóticas, cadeias de extinção e mudanças climáticas (MITTERMEIER e SCARANO, 2013).

Dentre os recursos genéticos vegetais voltados para a alimentação e agricultura, as espécies frutíferas destacam-se pela grande diversidade e potencial que apresentam, sendo que o Brasil é um dos mais importantes centros de diversidade genética de espécies frutíferas tropicais. É possível encontrar na região nordeste grande variabilidade das diversas espécies nativas e exóticas, existentes adaptadas e com potencial para o mercado interno, exportação e diversificação agrícola (CARVALHO et al, 2009).

Em programas de melhoramento os recursos genéticos vegetais são os mais utilizados considerando a necessidade de manutenção da variabilidade genética e constituem o germoplasma vegetal. Os meios de conservação da biodiversidade de espécies “*ex situ*” e “*in situ*” variam de acordo com objetivos e prioridades. Estes meios são considerados complementares e para populações naturais, especialmente de espécies perenes, a conservação “*in situ*” tem sido apontada como a mais indicada. Assim, a conservação “*in situ*” proporciona a capacidade de proteção à uma gama de recursos de diferentes espécies e os processos adaptativos que estão ocorrendo naturalmente nas populações naturais (NASS, 2001).

Outra forma utilizada de conservação de recursos genéticos é a conservação *on farm*, também conhecida como conservação em cultivo – uma modalidade na qual existe a participação de agricultores, comunidades tradicionais ou indígenas. Recentemente vários países estão investindo na conservação de amostras de DNA. Os bancos de DNA têm como objetivo principal conservar amostras para estudos de taxonomia, principalmente de espécies em risco de extinção (PÁDUA e FERREIRA, 2008).

O conhecimento dos padrões de variabilidade entre e dentro das populações é uma poderosa e indispensável ferramenta, sendo crucial para auxiliar na escolha das práticas mais eficientes quanto a conservação, fornecendo subsídios para adoção de estratégias na conservação de recursos vegetais (RENAU-MORATA et al., 2005).

Os bancos de germoplasma são repositórios onde se armazena e conseqüentemente se conserva a variabilidade genética de uma ou de várias espécies sob a forma de sementes, explantes *in vitro* ou plantas a campo. Mundialmente cerca de 93% dos acessos das coleções de germoplasma de fruteiras são conservados no campo e apenas 7% são conservados na forma de sementes ou *in vitro*. O Brasil apresenta mais de 15 mil acessos em coleções de germoplasma de fruteiras, sendo a Embrapa uma das instituições do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA) que concentra grande número de acessos com ampla variabilidade genética (FERREIRA, 2011).

A caracterização molecular de germoplasma gera grande quantidade de informações sobre a identidade genética, a diversidade, a frequência gênica e os relacionamentos filogenéticos dos seus recursos. Tais informações são muito úteis na escolha de diferentes estratégias para conservação como a *ex situ*, *in situ* e *on farm* (FERREIRA, 2011). Por meio da caracterização dos genótipos é possível a identificação de genes envolvidos em características agrônômicas de interesse como: aumento de produção, qualidade, e coloração dos frutos, adaptação a várias condições edafoclimáticas e, conseqüentemente a expansão do mercado (GONÇALVES et al., 2008).

2.3. Marcadores moleculares

Os avanços da genética e da biologia molecular, principalmente, o advento da tecnologia do DNA recombinante, da reação em cadeia da polimerase (PCR) e do sequenciamento automático do DNA propiciaram o desenvolvimento de poderosas técnicas para o desenvolvimento de marcadores genéticos úteis na identificação, caracterização e avaliação dos recursos genéticos vegetais (FALEIRO, 2007).

Desde o surgimento dos marcadores moleculares, na década de 1980, a manipulação de DNA vem ganhando volume em informações disponíveis. Apresentando vantagens sobre os outros tipos de marcadores como o fornecimento de um número praticamente ilimitado de polimorfismos distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma com segurança, rapidez e eficiência e sem a necessidade da ocorrência da expressão fenotípica, e consequentemente excluindo-se a influência do meio ambiente e do estágio fisiológico da planta, permitindo a identificação precisa dos genótipos mesmo em estádios iniciais do desenvolvimento (GUIMARÃES et al, 2009).

Devido ao crescente desenvolvimento e a utilização generalizada de diferentes metodologias durante os últimos anos diversos estudos comparativos foram realizados com o objetivo de escolher a melhor tecnologia de marcadores de DNA a ser utilizada em estudos de diversidade e *fingerprinting*, considerando reprodutibilidade, custos, sensibilidade e nível de detecção de polimorfismos (GOULÃO e OLIVEIRA, 2001).

Entre os marcadores moleculares que se baseiam na análise do DNA genômico, estão o RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) ou polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição, os Minissatélites ou VNTR (Variable Number Tandem Repeats), o RAPD (“Randomly Amplified Polymorphic DNA”), ou polimorfismo de DNA amplificados ao acaso, o AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados, e os microsatélites (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1988).

Marcadores ISSR (Sequências Simples Repetidas Internas) são *primers* desenhados com base em sequências repetidas dos microsatélites na extremidade 5', acrescentando-se alguns nucleotídeos na extremidade 3'. Assim, os *primers* anelam-se dentro das repetições e amplificam as regiões genômicas entre os microsatélites, cujos tamanhos dos fragmentos são limitados pela própria técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) (GUIMARÃES et al. 2009).

A utilização de marcadores ISSR se encontra bastante difundida, pois para seu uso não é necessária informação genômica prévia sendo uma técnica que requer apenas pequenas quantidades de DNA. Além disso, estes marcadores mostram maior robustez na repetibilidade em uma vasta gama de parâmetros da PCR. Sua utilização tem sido estabelecida para diversas aplicabilidades, sendo utilizada tanto para a biologia da conservação como para a ecologia molecular e sistemática (GHARBAWI, 2015).

Diversos trabalhos na literatura revelam que o uso dos marcadores moleculares está complementando a caracterização morfológica e agrônômica tradicional (TOPPA e JADOSKI, 2013), pois o uso de descritores baseados no genótipo consegue distinguir com eficiência genótipos morfológicamente similares e geneticamente aparentados. Goulão e Oliveira (2001) descrevem a utilização de marcadores ISSR particularmente no caso de frutíferas com longo período juvenil tendo como vantagem a rapidez para a caracterização de novos híbridos.

Investigações com uso de marcadores ISSR têm sido realizadas com diversas frutíferas a exemplo do umbu-cajazeira (SANTANA et al., 2011) jenipapo (SILVA et al., 2014), biribá (LORENZONI et al., 2014), morango (NUNES et al., 2013), maracujá (COSTA et al., 2012), manga (ROCHA et al., 2012), goiaba e araçá (MANI et al., 2011), goiaba (RAI et al., 2012), (OLIVEIRA et al, 2014) e amora (KAR et al., 2008).

No entanto, estudos de diversidade genética com cambuizeiros, usando esses marcadores moleculares são inéditos, demonstrando que a utilização de marcadores genéticos em estudos populacionais para esta espécie é essencialmente importante como ferramenta com grande poder de discriminação para criação de banco de germoplasma da espécie.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Folhas jovens de 50 cambuizeiros foram coletadas em população nativa, no mês de maio de 2015. A área está situada na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) do Caju (Figura 1), pertencente ao Campo Experimental da Embrapa Tabuleiros Costeiros, no município de Itaporanga d'Ajuda, SE (lat -11.116585°, log -37.186742°) (Figura 2). A área é típica da restinga, cujo solo é do tipo espodossolo humilúvico. As folhas foram retiradas das árvores e acondicionadas em sacos de plástico, previamente identificados e transportados em caixas térmicas resfriadas até o Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju. O material foi armazenado a -80°C para posterior extração de DNA.



Figura 1. População natural de cambuizeiro. Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN), Campo Experimental de Itaporanga d'Ajuda da Embrapa Tabuleiros Costeiros. São Cristovão, SE, 2016.



3.2. Extração de DNA

Usou-se 1g da folha para realização da extração do DNA, de acordo com metodologia de Romano e Brasileiro (2003). Após o pré-aquecimento a 65°C da solução de extração CTAB 2% (NaCl 5 M; Tris HCl 1 M pH 8,0; EDTA 0,5 M) adicionou-se 1mL ao material pulverizado, acrescentado 2 µL de β-mercaptoetanol e 3µL de proteinase K (10 mg/mL) em cada 1mL de tampão usado. Em seguida as amostras foram incubadas a 65°C por trinta minutos, homogeneizadas a cada dez minutos, e mantidas em repouso por mais trinta minutos. Foram feitas extrações utilizando primeiramente 500 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e depois utilizando 400 µL de isopropanol gelado permanecendo em *overnight* a -20°C. O precipitado obtido foi lavado por três vezes, sendo duas lavagens com etanol 70% e uma vez com etanol 100%. Após a secagem o DNA foi ressuscitado em 44 µL de tampão TE

(Tris-HCl 100 mM pH 7,4 e 1mM de EDTA) tratado com 6 μ L de RNase (20mg/ml) e finalizado com incubação a 37°C por trinta minutos.

3.3. Eletroforese, quantificação do DNA e diluição

A avaliação da qualidade do DNA foi realizada pelo método da eletroforese em gel de agarose 0,8%, no qual foram utilizadas alíquotas de 2 μ L de cada amostra, 8 μ L de água MilQ esterilizada e 2 μ L de solução de carregamento (azul de bromofenol 0,01%; glicerol 40%). Foi realizada a eletroforese horizontal durante 45 minutos a 76 V, 38 mA e 120 W. Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio, onde permaneceu imerso por cerca de 40 minutos e em seguida fotodocumentado pelo equipamento Gel doc L-pix HE (Loccus Biotecnologia, Brasil) (Figura 3).

As concentrações das amostras de DNA foram observadas em NanoDrop 2000c (Thermo Scientific®). As soluções de trabalho de DNA (10 ng/ml) foram preparadas diluindo as amostras em solução tampão TE e em seguida foram armazenadas a -20°C.

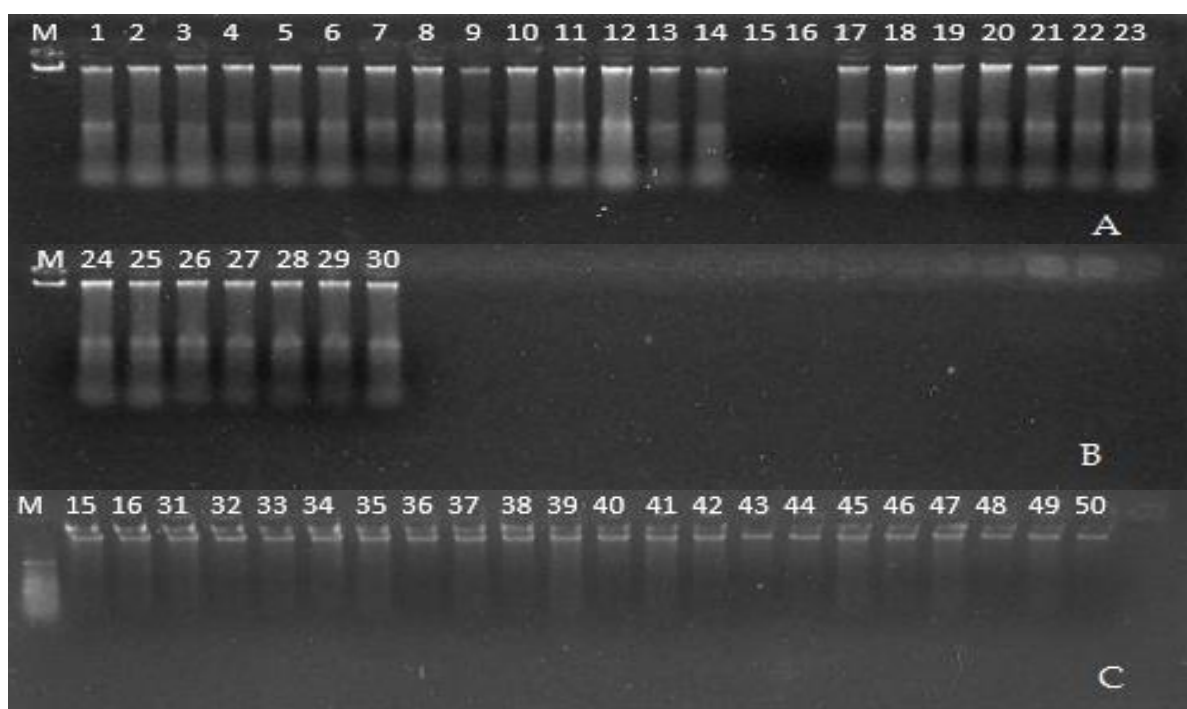


Figura 3. Visualização do DNA de cambuizeiro. (A) e (B) referente à extração das amostras 1 a 30 (C) referente à extração das amostras 15, 16 e 31 a 50. São Cristóvão, SE, 2016.

3.4. Teste e seleção de primers ISSR

Foram testados 30 iniciadores de síntese (primers) em gel de agarose 2% (Tabela 1). Cada reação teste foi realizada contendo 1 μ L de DNA genômico (10 ng/ μ L), 1,0 μ L de cada iniciador (5 mM), 14,8 μ L de água MilQ esterilizada, 2 μ L de tampão de reação 10X, 0,6 μ L de $MgCl_2$, 0,4 μ L de dNTP (10 nM), 0,2 de Taq polimerase (5U/ μ L), totalizando volume final de reação de 20 μ L. As temperaturas de anelamento ideais variaram entre 44,6 e 57,2 °C.

Tabela 1. Primers ISSR, respectivas sequências e temperaturas de anelamento. São Cristóvão, SE. 2016.

Primers	Sequência (5' – 3')	Ta (°C)*
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	47,0
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	57,2
UBC 810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	45,4
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	46,8
UBC 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	55,8
UBC 813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	44,6
UBC 815	CTC TTC TCT CTC TCT CTG	47,6
UBC 816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	55,8
UBC 817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	50,3
UBC 818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	57,2
UBC 820	GTG TGT GTG TGT GTG TC	47,5
UBC 823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	57,2
UBC 826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	57,2
UBC 828	TGT GTG TGT GTG TGT GA	54,8
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	45,6
UBC 835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	50,2
UBC 841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	48,5
UBC 843	CTC TCT CTC TCT CTC TRA	56,5
UBC 845	CTC TCT CTC TCT CTC TRG	48,1
UBC 848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG	52,7
UBC 851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG	49,2
UBC 855	ACA CAC ACA CAC ACY T	53,1
UBC 856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	56,5
UBC 857	ACA CAC ACA CAC ACY G	58,8
UBC 858	TGT GTG TGT GTG TGT GRT	56,5
UBC 864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	50,8
UBC 878	GGA TGG ATG GAT GGA	53,4
ISSR 2	CTC TCT CTC TCT CTC TAC	51,5
ISSR 3	CTC TCT CTC TCT CTC TTG	51,5
ISSR 5	CTC TCT CTC TCT CTC TGC	51,5

* Temperatura de anelamento

3.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese e documentação

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas contendo 1 µL de DNA genômico (10 ng/µL), 1,0 µL de cada iniciador (5 mM), 14,8 µL de água MilQ esterilizada, 2 µL de tampão de reação 10X, 0,6 µL de MgCl₂, 0,4 µL de dNTP (10 nM), 0,2 de Taq polimerase (5U/µL), totalizando volume final de reação de 20 µL. Em seguida, o material foi amplificado em termociclador Proflex®, onde as amostras foram submetidas à desnaturação a 94 °C por quatro minutos, seguida por 37 ciclos de amplificação. A cada ciclo houve a desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento por 45 segundos, e extensão a 72 °C por 2 minutos. Após os ciclos de reação, o processo foi encerrado com uma extensão final a 72 °C por 7 minutos, seguida de resfriamento a 4 °C.

Produtos das reações, em gel de agarose 2%, foram submetidos à eletroforese com voltagem de 250 V, 145 mA e 120 W, durante três horas. Para padronização de bandamento, utilizou-se 10 µL do marcador de peso molecular de 100 pb.

Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio, onde permaneceu imerso por cerca de 40 minutos e em seguida fotodocumentado pelo equipamento Gel doc L-pix HE (Loccus Biotecnologia, Brasil).

3.6. Identificação do número ótimo de bandas

Para verificar se o número de marcadores gerados foi suficiente para analisar o grupo amostral de 50 genótipos, foram realizados *Bootstrap* a partir de simulações com reamostragens de diferentes tamanhos (a partir de 60 com incremento=10), sendo cada uma repetida 5.000 vezes por aplicação do *software* DBoot (COELHO, 2001).

3.7. Análise dos dados

O perfil eletroforético de cada gel foi analisado visualmente e, segundo a ausência (0) ou presença (1) do fragmento, foi gerada uma matriz binária. Os dados binários foram utilizados para realizar todas as análises seguintes. A matriz produzida foi utilizada para a obtenção das estimativas de similaridades genéticas, empregando-se o coeficiente de Jaccard com auxílio do programa FreeTree (PAVLICEK et al., 1999).

Os parâmetros de diversidade genética, tais como número de alelos observados, número de alelos efetivos, diversidade genética de Nei e índice de Shannon foram calculados usando o programa Genalex 6.3 (PEAKALL e SMOUSE, 2006). O número total de alelos (N_a), número efetivo de alelos (N_e) e heterozigosidade esperada (H_e) foram obtidas com base na metodologia descrita por Lynch e Milligan (1994) e Maguire et al. (2002). O índice de diversidade genética de Shannon (I) foi obtido de acordo com Brown e Weir (1983).

O dendrograma foi gerado usando o algoritmo UPGMA (Método da Média Aritmética Não Ponderada), do *software* TreeView, de acordo com o coeficiente de Jaccard. A consistência do dendrograma foi avaliada pela correlação cofenética entre as distâncias geradas pelo dendrograma e as distâncias genéticas entre pares.

Para destacar o agrupamento foi efetuado o método de reamostragem *bootstrap* com o mesmo tamanho da amostra original, sendo que para cada nível de reamostragem, foram obtidas 10.000 amostras Bootstrap TreeView (PAGE, 1996).

O agrupamento das amostras considerando o método de análise de coordenadas principais (ACoP) foi realizado com auxílio do programa Genalex 6.3 utilizando o coeficiente de (di)similaridade de Jaccard, obtida pelo programa FreeTree (PAVLICEK et al., 1999).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise ISSR

Dentre os 30 primers testados, 10 apresentaram bandas polimórficas e informativas. Na amplificação das amostras foram gerados 71 locos, sendo 70 polimórficas (98,3%), variando de quatro (UBC 820) a 10 locos (UBC 848) por primer (Tabela 2).

Diversos trabalhos realizados utilizando os marcadores ISSR obtiveram eficiente desempenho na avaliação da divergência genética na obtenção de polimorfismo, onde Silva et al. (2014) obtiveram 123 bandas polimórficas utilizando 12 *primers* em trabalho de diversidade e estrutura genética de jenipapo (*Genipa americana* L.). Lorenzoni et al. (2014)

avaliando a divergência genética de 16 acessos de biribazeiro (*Rollinia mucosa* [Jacq.] Baill) obtiveram 118 bandas polimórficas através de 13 *primers*. Santana et al. (2011) ao caracterizar a variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira (*Spondias* sp), do BAG de frutas tropicais da Embrapa Mandioca e Fruticultura, obtiveram 201 bandas polimórficas através de 25 *primers*. Jimenez et al. (2015) avaliando a diversidade de 38 indivíduos de mangabeira provenientes de populações naturais no Estado de Pernambuco obtiveram 83 bandas polimórficas com o uso de seis *primers*.

Tabela 2. Relação dos *primers* ISSR, número de total de bandas, porcentagem de polimorfismo e amplitude de bases, gerados pelas reações de PCR para estudo da diversidade genética entre indivíduos de população de cambuizeiro. São Cristóvão, SE. 2016.

Primers	Número de bandas	Nº de Bandas Polimórficas (NBP)	Porcentagem de polimorfismo (%)	Amplitude de pares de Bases (pb)
UBC 807	07	07	100	500 - 1650
UBC 813	07	07	100	850 - 2000
UBC 818	07	07	100	500 - 2000
UBC 820	04	04	100	850 - 2000
UBC 834	06	06	100	1000 - 3000
UBC 835	09	09	100	850 - 2000
UBC 841	07	07	100	500 - 1000
UBC 845	07	07	100	400 - 2000
UBC 848	10	10	100	500 - 3000
ISSR 3	07	06	85	850 - 2000
-	71	70	98,3	-

Em Myrtaceae, Oliveira *et al.* (2014) analisando a distância genética entre acessos de goiabeira e araçazeiros do gênero *Psidium*, pertencente ao BAG da Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, obtiveram 216 bandas polimórficas com uso de 17 *primers*. Mani *et al.* (2011) em estudo na Índia de caracterização morfológica associada a caracterização molecular por ISSR e RAPD entre espécies do gênero *Psidium* obtiveram 234 bandas polimórficas através de 31 *primers* ISSR.

Em outras culturas de importância econômica o uso de marcadores ISSR também foi eficiente, onde Dhanorkar *et al.* (2005) na análise das relações genéticas entre variedades de videira (*Vitis* spp.) utilizando 13 *primers* obtiveram 96 bandas polimórficas. Kar et al. (2008) em estudo sobre variabilidade com amoreira (*Morus* spp.), obtiveram 85 bandas polimórficas utilizando 14 *primers*, e Silva et al. (2011) avaliando a diversidade em acessos de mandioca obtiveram 154 bandas polimórficas com o uso de 20 *primers*.

4.2. Número ótimo de bandas

O número de bandas polimórficas é considerado ótimo quando o coeficiente de variação for menor do que 1%. De acordo com Silva et al. (2013, 2014) existe uma relação diretamente proporcional entre o número de fragmentos gerados e o coeficiente de variação (CV%), havendo uma clara diminuição da variação quando há o aumento do número de fragmentos (Figura 4). No presente trabalho percebeu-se uma estabilização a partir de 60 fragmentos, sugerindo que os resultados obtidos pelos fragmentos utilizados neste estudo (71) podem ser usados para a análise da diversidade.

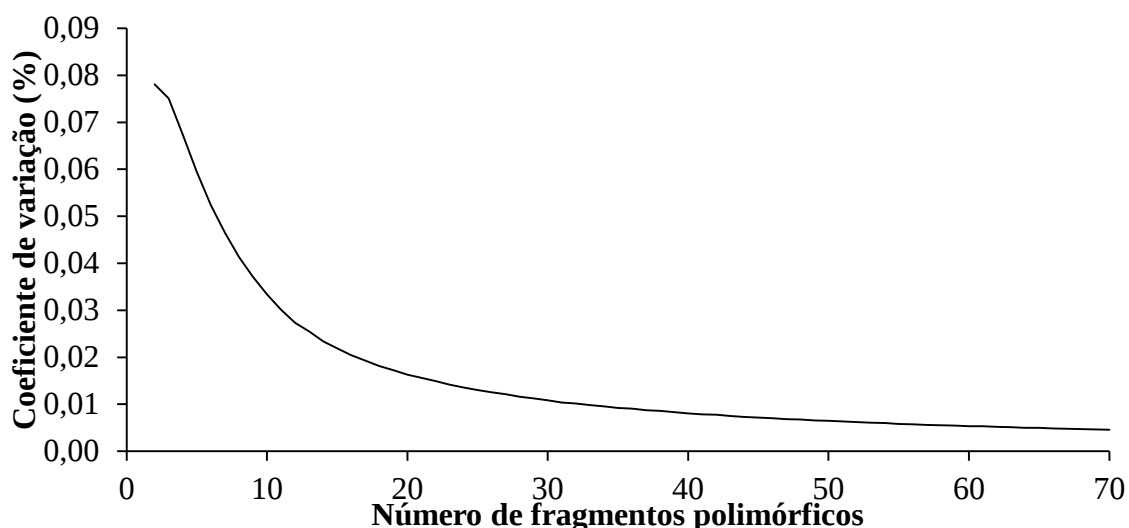


Figura 4. Coeficiente de variação (CV%) em função do número de fragmentos em 50 indivíduos de cambuzeiro (*Myrciaria tenella* O. Berg), com base nas similaridades genéticas obtidas pelo método de *bootstrap* com 5.000 reamostragens. São Cristóvão, SE, 2016.

O Número Total de Alelos Efetivos (NE) variou de 0,57 a 1,89 e a variação para o Índice de Shannon (I) foi de 0,30 a 0,66. Quanto aos valores de Diversidade genética (H), a variação foi de 0,18 a 0,47 (Tabela 3).

Neste trabalho o Índice de Shannon (I) obtido foi de 0,52. De acordo com Pádua (2011) o valor do índice de Shannon pode variar entre 0 e 1, sendo 1 o ápice de diversidade de uma população; dessa forma, a população em estudo apresenta considerável nível de diversidade genética. Considerado boa ferramenta para análise de populações utilizando marcadores dominantes por apresentar relativa neutralidade aos efeitos da distorção causada pela incapacidade de detectar locos heterozigotos (DAWSON *et al.*, 1995).

No estudo da diversidade genética em populações naturais de buriti (*Mauritia flexuosa*) Rossi *et al.* (2014) encontraram maiores valores para (I) e (H) avaliando a distribuição da diversidade genética entre e dentro das populações.

Tabela 3. Número de alelos (Na); Número efetivo de alelos (Ne); Índice de Shannon (I) e Diversidade genética (H) em estudo da diversidade genética de população de cambuzeiro (*Myrciaria tenella* O. Berg), utilizando marcadores ISSR. São Cristóvão, SE, 2016.

Primer	Na	Ne	I	H
UBC 807	2	1,80	0,63	0,44
UBC 813	2	1,89	0,66	0,47
UBC 818	2	1,42	0,43	0,27
UBC 820	2	1,69	0,54	0,38
UBC 834	2	1,73	0,60	0,42
UBC 835	2	1,55	0,51	0,34
UBC 841	2	1,52	0,46	0,30
UBC 845	2	1,56	0,52	0,35
UBC 848	2	0,57	0,57	0,39
ISSR 3	2	1,26	0,30	0,18
TOTAL	2	1,50	0,52	0,35

Ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho, Chagas et al. (2015) encontraram baixo valor médio de (I) no estudo de uma população de dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.) utilizando marcadores ISSR, indicando baixa diversidade entre os indivíduos analisados. Costa et al. (2011) observaram baixa diversidade, através do Índice de Shannon utilizando marcadores RAPD, entre acessos de mangabeira do banco de germoplasma de Sergipe. Silva et al. (2016) em avaliação da diversidade em cultivos comerciais de cupuaçuzeiro também encontraram baixos valores para o Índice de Shannon, neste caso confirmando a uniformidade dos cultivos.

Em condições naturais, o valor H é sempre diferente de zero, porque os indivíduos são susceptíveis à incorporação de novos alelos por cruzamento, mesmo em pequenas populações ou fragmentos, além das perdas devido à deriva genética (SILVA et al., 2014).

4.3. Diversidade genética

A ocorrência de diversidade entre os indivíduos estudados utilizando marcadores ISSR sugere a eficiência da técnica para identificação de diversidade, onde os indivíduos mais divergentes em relação ao conjunto considerado foram C1 e C2 (Tabela 4). A similaridade média foi de 0,58.

A menor similaridade foi observada entre os indivíduos C1 e C41 (0,30 SJ), enquanto a maior similaridade entre os indivíduos C13 e C17 (0,92 SJ). Os pares de indivíduos mais similares foram C26 e C28 (0,80 SJ), C6 e C7, C36 e C38 (0,81 SJ), C12 e C13, C12 e C14, C13 e C14, C17 e C19, C34 e C35, C34 e C36 (0,82 SJ), C8 e C9 (0,83 SJ), C17 e C18 (0,84 SJ), C12 e C17, C14 e C17, C19 e C20, C36 e C39 (0,85 SJ), C18 e C19 (0,86 SJ), C7 e C8 (0,87 SJ), C5 e C17, C27 e C28 (0,88 SJ).

Baseado na similaridade de Jaccard (SJ) foi possível identificar seis grupos na análise UPGMA (Figura 5). Os indivíduos mais distantes e divergentes estão alocados no grupo G1, sendo o C1 (0,31 SJ) e C41 (0,36 SJ) os que ficaram totalmente isolados dos outros indivíduos. O maior agrupamento foi o G2, com 21 indivíduos, destacando-se do C22 (0,61 SJ) e o mais próximo o C13 e C17 (0,92 SJ). No grupo G3 houve 12 indivíduos, com destaque para C49 (0,63 SJ) e o par C46 e C47 (0,88 SJ). O grupo G4 possui cinco indivíduos, tendo o C22 (0,57 SJ) como mais distante. Os grupos G5 e G6 foram os menores grupos, com três genótipos cada um. De acordo com Oliveira et al. (2009) geralmente os grupos maiores, formados por mais acessos, agrupam os pares que apresentam menores distâncias, uma vez que o tamanho do grupo é delimitado por uma distância média entre os pares de indivíduos.

Observa-se uma grande distribuição dos genótipos na maioria dos grupos formados, indicando uma ampla diversidade entre os genótipos avaliados. Essa alta variabilidade pode ser explicada segundo Oliveira et al., (2007) pela tendência a alogamia de espécies ainda não domesticadas. Assim como observado no trabalho de Santana et al. (2011) onde encontraram alta variabilidade entre os 17 acessos de umbu-cajazeira, espécie ainda em domesticação.

Tabela 4. Matriz da similaridade genética do coeficiente de Jaccard (1908) obtida utilizando 10 iniciadores de síntese (primers) pela técnica PCR entre 50 indivíduos de população natural de cambuzeiro. São Cristóvão, SE. 2016.

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25
C1																									
C2	0,51																								
C3	0,42	0,67																							
C4	0,45	0,44	0,63																						
C5	0,42	0,52	0,71	0,62																					
C6	0,45	0,50	0,63	0,70	0,75																				
C7	0,43	0,45	0,58	0,55	0,67	0,81																			
C8	0,51	0,52	0,63	0,56	0,65	0,79	0,87																		
C9	0,52	0,53	0,67	0,57	0,71	0,78	0,77	0,83																	
C10	0,49	0,60	0,57	0,45	0,69	0,57	0,52	0,60	0,67																
C11	0,41	0,49	0,69	0,62	0,70	0,72	0,75	0,73	0,72	0,59															
C12	0,48	0,46	0,65	0,62	0,77	0,72	0,71	0,73	0,72	0,66	0,71														
C13	0,47	0,51	0,69	0,66	0,88	0,76	0,68	0,66	0,73	0,70	0,71	0,82													
C14	0,44	0,49	0,62	0,59	0,77	0,76	0,71	0,73	0,72	0,66	0,64	0,82	0,82												
C15	0,47	0,68	0,60	0,41	0,58	0,57	0,58	0,63	0,60	0,77	0,55	0,59	0,60	0,62											
C16	0,44	0,54	0,77	0,67	0,78	0,67	0,62	0,67	0,70	0,67	0,72	0,79	0,75	0,76	0,60										
C17	0,46	0,50	0,69	0,62	0,88	0,76	0,71	0,69	0,76	0,69	0,67	0,85	0,92	0,85	0,59	0,78									
C18	0,42	0,41	0,56	0,62	0,73	0,65	0,60	0,58	0,65	0,59	0,57	0,70	0,80	0,70	0,49	0,65	0,84								
C19	0,42	0,46	0,64	0,64	0,75	0,67	0,66	0,64	0,71	0,62	0,66	0,73	0,76	0,73	0,52	0,74	0,82	0,86							
C20	0,38	0,48	0,61	0,58	0,72	0,67	0,63	0,64	0,67	0,58	0,63	0,60	0,70	0,69	0,51	0,64	0,69	0,72	0,85						
C21	0,38	0,49	0,63	0,59	0,64	0,66	0,57	0,62	0,63	0,50	0,65	0,55	0,59	0,61	0,52	0,63	0,58	0,52	0,63	0,74					
C22	0,47	0,51	0,55	0,52	0,60	0,58	0,47	0,48	0,55	0,62	0,54	0,51	0,58	0,54	0,58	0,62	0,55	0,51	0,62	0,59	0,57				
C23	0,44	0,51	0,63	0,57	0,61	0,60	0,56	0,60	0,63	0,52	0,59	0,56	0,63	0,59	0,51	0,63	0,59	0,61	0,70	0,67	0,62	0,71			
C24	0,44	0,52	0,56	0,50	0,61	0,66	0,68	0,70	0,70	0,50	0,58	0,58	0,62	0,65	0,59	0,57	0,65	0,71	0,73	0,74	0,65	0,54	0,72		
C25	0,40	0,56	0,66	0,54	0,71	0,66	0,61	0,66	0,66	0,63	0,65	0,65	0,69	0,65	0,63	0,66	0,68	0,67	0,70	0,73	0,72	0,55	0,65	0,76	

Tabela 4. (Continuação) Matriz da similaridade genética do coeficiente de Jaccard (1908) obtida utilizando 10 iniciadores de síntese (*primers*) pela técnica PCR entre 50 indivíduos de população natural de cambuízeiro. São Cristóvão, SE. 2016.

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25
C26	0,35	0,47	0,59	0,56	0,70	0,59	0,55	0,53	0,59	0,57	0,64	0,58	0,68	0,58	0,53	0,63	0,64	0,73	0,75	0,73	0,62	0,57	0,71	0,71	0,71
C27	0,40	0,46	0,64	0,61	0,68	0,70	0,62	0,60	0,64	0,55	0,69	0,65	0,69	0,63	0,52	0,67	0,66	0,68	0,76	0,74	0,63	0,68	0,78	0,69	0,72
C28	0,37	0,47	0,62	0,56	0,67	0,69	0,61	0,59	0,62	0,54	0,71	0,61	0,65	0,58	0,50	0,65	0,61	0,67	0,72	0,69	0,65	0,67	0,77	0,71	0,71
C29	0,38	0,42	0,55	0,55	0,56	0,55	0,53	0,51	0,52	0,41	0,51	0,57	0,55	0,51	0,42	0,58	0,54	0,56	0,62	0,56	0,60	0,53	0,64	0,60	0,60
C30	0,38	0,44	0,56	0,46	0,57	0,56	0,53	0,55	0,56	0,46	0,51	0,54	0,59	0,58	0,44	0,56	0,58	0,57	0,57	0,64	0,55	0,41	0,53	0,62	0,66
C31	0,33	0,43	0,62	0,56	0,67	0,59	0,57	0,55	0,62	0,47	0,71	0,55	0,62	0,52	0,43	0,65	0,61	0,63	0,69	0,63	0,55	0,54	0,62	0,61	0,65
C32	0,31	0,31	0,53	0,50	0,49	0,47	0,54	0,49	0,50	0,33	0,55	0,49	0,48	0,43	0,37	0,54	0,50	0,49	0,52	0,43	0,52	0,42	0,57	0,49	0,47
C33	0,38	0,45	0,55	0,49	0,62	0,55	0,56	0,57	0,61	0,52	0,60	0,54	0,61	0,51	0,51	0,55	0,60	0,59	0,62	0,56	0,60	0,56	0,61	0,60	0,63
C34	0,36	0,40	0,54	0,57	0,70	0,57	0,50	0,48	0,57	0,52	0,56	0,59	0,71	0,62	0,45	0,60	0,71	0,70	0,67	0,58	0,65	0,53	0,60	0,59	0,69
C35	0,35	0,40	0,60	0,60	0,68	0,60	0,53	0,54	0,60	0,55	0,62	0,62	0,69	0,56	0,48	0,67	0,69	0,75	0,67	0,58	0,63	0,50	0,60	0,57	0,73
C36	0,33	0,43	0,52	0,55	0,65	0,55	0,47	0,45	0,55	0,49	0,51	0,54	0,66	0,56	0,43	0,58	0,65	0,71	0,70	0,61	0,57	0,56	0,63	0,63	0,63
C37	0,38	0,35	0,44	0,42	0,49	0,47	0,51	0,46	0,53	0,39	0,46	0,49	0,48	0,46	0,40	0,48	0,50	0,55	0,57	0,45	0,43	0,48	0,59	0,58	0,50
C38	0,35	0,37	0,52	0,52	0,69	0,58	0,56	0,51	0,64	0,55	0,54	0,60	0,67	0,60	0,45	0,61	0,69	0,72	0,75	0,65	0,54	0,56	0,61	0,60	0,63
C39	0,33	0,41	0,53	0,50	0,66	0,53	0,48	0,46	0,58	0,56	0,55	0,57	0,64	0,55	0,46	0,59	0,67	0,73	0,75	0,65	0,55	0,57	0,61	0,61	0,67
C40	0,39	0,38	0,51	0,45	0,65	0,57	0,55	0,56	0,60	0,60	0,59	0,62	0,66	0,56	0,53	0,63	0,65	0,65	0,67	0,61	0,53	0,55	0,60	0,59	0,63
C41	0,30	0,40	0,45	0,33	0,47	0,36	0,36	0,37	0,39	0,44	0,44	0,41	0,46	0,35	0,43	0,40	0,45	0,47	0,44	0,43	0,35	0,46	0,43	0,40	0,42
C42	0,40	0,48	0,52	0,46	0,63	0,52	0,44	0,45	0,49	0,62	0,51	0,57	0,71	0,54	0,54	0,56	0,63	0,66	0,62	0,56	0,51	0,59	0,58	0,57	0,61
C43	0,39	0,38	0,52	0,43	0,54	0,43	0,44	0,42	0,43	0,46	0,45	0,48	0,59	0,45	0,44	0,47	0,58	0,57	0,54	0,44	0,48	0,47	0,53	0,51	0,52
C44	0,41	0,43	0,51	0,45	0,56	0,45	0,46	0,50	0,48	0,45	0,50	0,53	0,58	0,47	0,40	0,49	0,57	0,60	0,59	0,52	0,47	0,43	0,52	0,53	0,51
C45	0,40	0,46	0,50	0,47	0,55	0,50	0,45	0,49	0,50	0,53	0,46	0,52	0,60	0,43	0,46	0,51	0,56	0,55	0,55	0,51	0,46	0,51	0,46	0,46	0,47
C46	0,39	0,46	0,58	0,53	0,69	0,61	0,54	0,52	0,61	0,58	0,57	0,60	0,73	0,60	0,49	0,61	0,72	0,75	0,74	0,65	0,57	0,59	0,61	0,63	0,64
C47	0,35	0,45	0,55	0,49	0,59	0,55	0,50	0,51	0,57	0,58	0,54	0,54	0,63	0,54	0,51	0,55	0,63	0,68	0,67	0,64	0,60	0,50	0,58	0,60	0,63
C48	0,31	0,46	0,58	0,53	0,60	0,55	0,51	0,52	0,55	0,56	0,54	0,60	0,61	0,52	0,52	0,59	0,63	0,65	0,68	0,59	0,55	0,54	0,58	0,57	0,64
C49	0,31	0,34	0,49	0,52	0,51	0,46	0,39	0,42	0,46	0,46	0,45	0,51	0,53	0,45	0,39	0,53	0,52	0,54	0,56	0,50	0,54	0,47	0,50	0,48	0,58
C50	0,33	0,35	0,48	0,54	0,53	0,51	0,43	0,44	0,48	0,45	0,50	0,47	0,55	0,44	0,38	0,49	0,54	0,56	0,58	0,55	0,50	0,52	0,55	0,50	0,57

Tabela 4. (Continuação) Matriz da similaridade genética do coeficiente de Jaccard (1908) obtida utilizando 10 iniciadores de síntese (*primers*) pela técnica PCR entre 50 indivíduos de população natural de cambuizeiro. São Cristóvão, SE. 2016.

	C26	C27	C28	C29	C30	C31	C32	C33	C34	C35	C36	C37	C38	C39	C40	C41	C42	C43	C44	C45	C46	C47	C48	C49	C50
C26																									
C27	0,78																								
C28	0,80	0,88																							
C29	0,63	0,70	0,73																						
C30	0,55	0,57	0,52	0,47																					
C31	0,67	0,65	0,67	0,57	0,61																				
C32	0,53	0,57	0,59	0,71	0,44	0,62																			
C33	0,66	0,64	0,63	0,58	0,47	0,63	0,57																		
C34	0,68	0,63	0,62	0,67	0,50	0,62	0,60	0,73																	
C35	0,65	0,67	0,69	0,61	0,53	0,65	0,60	0,71	0,82																
C36	0,65	0,64	0,65	0,64	0,50	0,62	0,51	0,64	0,82	0,76															
C37	0,53	0,57	0,62	0,67	0,36	0,55	0,59	0,54	0,59	0,60	0,69														
C38	0,66	0,64	0,63	0,62	0,47	0,63	0,57	0,68	0,76	0,74	0,81	0,70													
C39	0,70	0,68	0,67	0,59	0,48	0,63	0,55	0,65	0,77	0,78	0,85	0,64	0,87												
C40	0,65	0,64	0,65	0,58	0,46	0,59	0,53	0,58	0,63	0,67	0,67	0,59	0,78	0,79											
C41	0,42	0,42	0,42	0,32	0,38	0,47	0,34	0,46	0,38	0,43	0,40	0,35	0,43	0,47	0,48										
C42	0,63	0,59	0,60	0,53	0,47	0,54	0,42	0,59	0,64	0,62	0,68	0,51	0,62	0,66	0,68	0,60									
C43	0,52	0,51	0,52	0,50	0,43	0,45	0,51	0,50	0,62	0,59	0,59	0,51	0,53	0,60	0,59	0,45	0,67								
C44	0,51	0,50	0,48	0,43	0,45	0,47	0,38	0,46	0,52	0,49	0,52	0,41	0,46	0,50	0,48	0,48	0,59	0,60							
C45	0,45	0,49	0,47	0,43	0,35	0,46	0,35	0,54	0,51	0,51	0,51	0,40	0,51	0,52	0,56	0,54	0,64	0,48	0,61						
C46	0,66	0,64	0,66	0,59	0,48	0,63	0,49	0,59	0,73	0,67	0,77	0,60	0,71	0,75	0,67	0,50	0,79	0,63	0,59	0,67					
C47	0,65	0,61	0,63	0,58	0,47	0,56	0,48	0,55	0,66	0,64	0,67	0,54	0,64	0,68	0,67	0,52	0,71	0,56	0,55	0,63	0,88				
C48	0,63	0,64	0,60	0,56	0,45	0,57	0,49	0,62	0,64	0,64	0,64	0,52	0,65	0,69	0,61	0,56	0,65	0,51	0,53	0,64	0,81	0,84			
C49	0,52	0,53	0,49	0,53	0,47	0,51	0,45	0,53	0,67	0,65	0,65	0,51	0,59	0,63	0,52	0,37	0,56	0,53	0,46	0,51	0,65	0,62	0,72		
C50	0,51	0,55	0,54	0,44	0,40	0,56	0,41	0,46	0,52	0,55	0,55	0,42	0,55	0,59	0,54	0,51	0,58	0,52	0,48	0,50	0,65	0,64	0,68	0,55	

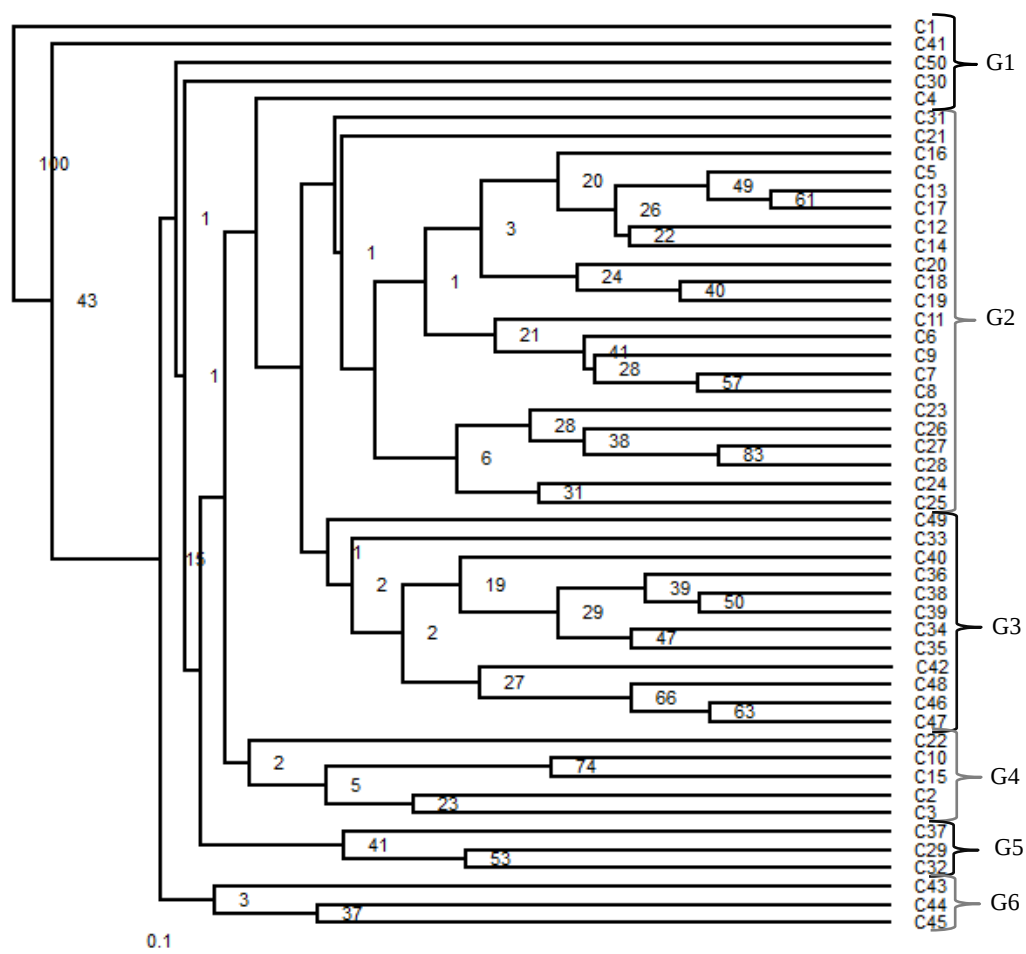


Figura 5 - Representação filogenética do agrupamento UPGMA estimado a partir da similaridade genética do coeficiente de Jaccard (1908), e análise Bootstrap (10.000x) para 50 indivíduos da população natural de cambuzeiro (*Myrciaria tenella* O. Berg). São Cristóvão, SE. 2016.

A Análise de Coordenadas Principais - ACoP (Figura 6) foi realizada a fim de determinar as relações genéticas entre os indivíduos com uma variação mínima. Nesse modelo de agrupamento houve a formação de onze grupos, onde se destacam subgrupos, promovendo uma maior diferenciação dos genótipos. Mesmo assim, confirma o agrupamento UPGMA, para alguns pares de indivíduos (C10/C15; C13/C17; C24/C25; C27/C28; C46/C47) que são os mais próximos geneticamente. Essa informação é importante no estabelecimento de uma coleção *ex situ* ou ações de intercâmbio de germoplasma; pois nesses casos, seria selecionado apenas um deles.

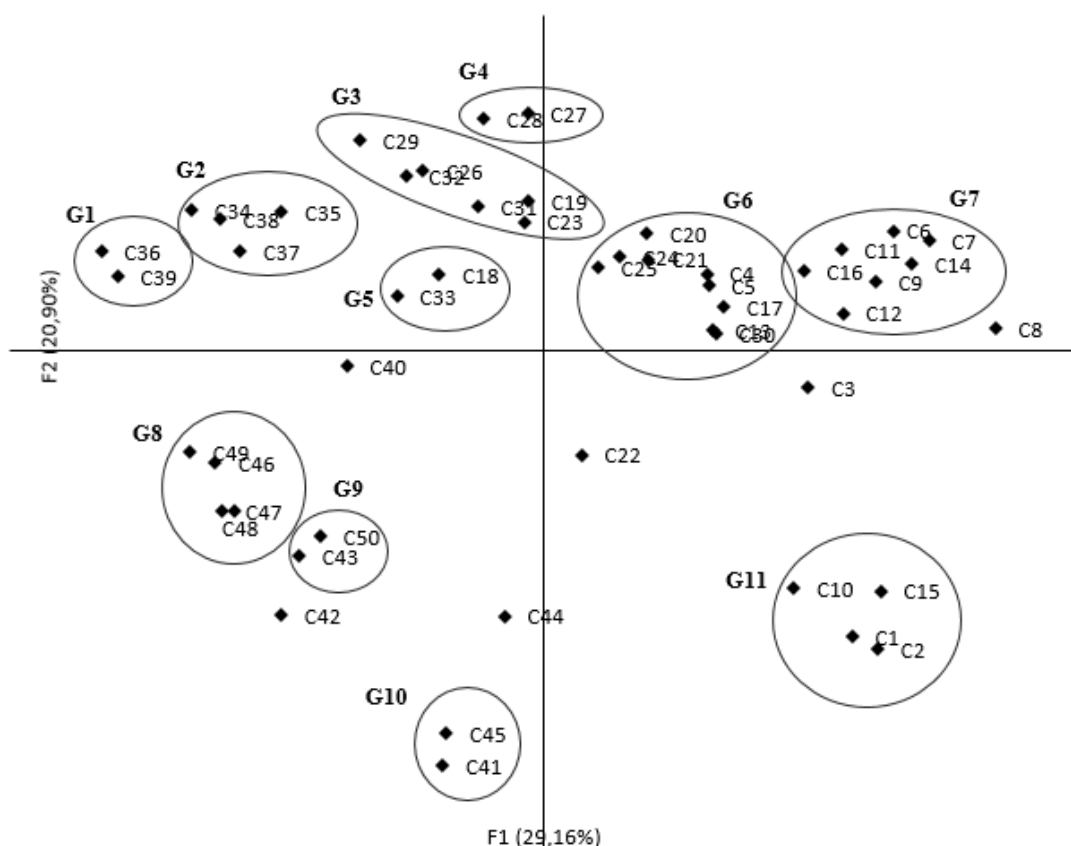


Figura 6. Análise de Coordenadas Principais (ACoP) entre 50 indivíduos da população natural de cambuzeiro (*Myrciaria tenella* O. Berg). São Cristóvão, SE. 2016.

O emprego de mais de um método de agrupamento, em razão das diferenças na hierarquização, otimização e ordenação dos grupos, permite que a classificação dos indivíduos se complemente em função dos critérios que cada técnica utiliza, e impede que inferências errôneas sejam adotadas na alocação de materiais, dentro de um determinado subgrupo de genótipos (SILVA et al., 2011).

A existência de alta variabilidade genética também foi observada por Pinheiro et al. (2011), utilizando marcadores RAPD em 20 indivíduos de uma população natural de cambuí.

O conhecimento da diversidade genética é condição fundamental para que haja evolução, uma vez que se constitui na mudança das frequências gênicas (NUNES et al., 2008). Em uma coleção de germoplasma essas informações poderão fornecer dados úteis para auxiliar na conservação, manejo e uso desses recursos genéticos, além de auxiliar o melhorista na identificação e seleção de clones ou parentes para estabelecer um programa de melhoramento genético básico.

5. CONCLUSÕES

Há diversidade genética na população natural de cambuzeiro avaliada. O nível de resolução genética e confiabilidade obtida por meio da análise com marcadores ISSR possibilitou a discriminação de genótipos diferentes geneticamente, que poderão ser utilizados para o manejo dos recursos genéticos da espécie.

Em situações de formação de coleção de germoplasma *ex situ* e intercâmbio de germoplasma os genótipos C1, C41, C50, C30 e C4 são os prioritariamente recomendados, por serem mais distantes geneticamente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILLIE, J.E.M., HILTON-TAYLOR, C., STUART, S.N. **2004 IUCN Red List of Threatened Species. A Global Species Assessment**. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, 2004.
- BIASOTO, A. C. T.; OLIVEIRA, E. A.; VOLTOLINI, T. V.; RYBKA, A. C. P. Potencial do cambuí (*Myrciaria tenella*) para elaboração de fermentado. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 9, Campinas. Anais... Campinas: UNICAMP/ FEA/ SLACA, 2011.
- BROWN, A.H.D.; WEIR, B.S. Measuring genetic variability in plant populations, in *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A* (Tanksley SD, Orton TJ, Editors). **Elsevier Science Publishing**, Amsterdam. p. 219-239. 1983
- CARVALHO, C. A. L.; DANTAS, A. C. V. L.; PEREIRA, F. A. DE C.; SOARES, A. C. F.; MELO FILHO, J. F.; OLIVEIRA, G. J. C. DE. **Tópicos em Ciências Agrárias**. Cruz das Almas, BA: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, 2009.
- CHAGAS, K. P.T.; SOUZA, R. F.; FAJARDO, C. G.; VIEIRA, F. A. Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineensis*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária) Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v.10, n.1, 2015.
- COELHO, A.S.G. **Dboot** - Avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variável de marcadores. Goiânia: Laboratório de Genética Vegetal, Instituto de Ciências Biológicas - UFG, 2001.
- COLOMBO, C. Genetic diversity characterization of casava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz) with RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.21, 1, p.105-113, 1998.
- COSTA, J. L., DE JESUS, O. N., OLIVEIRA, G. A. F., & DE OLIVEIRA, E. J. Efeito da seleção na variabilidade genética em maracujazeiro amarelo. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 12, n. 4, p. 253-260, Dec. 2012.
- COSTA, T. S., SILVA, A. V. C. DA, LÉDO, A. DA S., SANTOS, A. R. F. DOS, & Silva JÚNIOR, J. F. DA. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 5, p. 499-508, 2011.
- DAWSON, I. K. A. J.; SIMONS, R.; WAUGH, W. P. Diversity and genetic differentiation among subpopulations of *Gliricidia sepium* revealed by PCR-based assays. **Heredity**, v. 74, p. 10-18. 1995.
- DHANORKAR, V. M.; TAMHANKAR, S. A.; PATIL, S. G.; RAO, V. S. ISSR-PCR for assessment of genetic relationship among grape varieties cultivated in India. **Vitis**, 44: 127–131, 2005.
- DUARTE, A. R. **Espécies de Myrtaceae de uma parcela permanente de Floresta Ombrofila Densa Baixo Montana no Parque Estadual Carlos Botelho, Município de Sete Barras – SP**. Dissertação. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 77 p. 2003.

FALEIRO, F. **Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina –DF: Embrapa Cerrados, 102 p, 2007.

FERREIRA, F. R. Germoplasma de fruteiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. SPE1, p. 1-6, 2011.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

FORZZA, R; C; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M.; CANHOS, D. A. L.; CARVALHO JR., A. A.; COELHO, M. A. N.; COSTA, A. F.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M. G.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; LUGHADHA, E. N.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, S.; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J. R.; SYLVESTRE, L.S.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D. C. New Brazilian floristic list highlights conservation challenges. **BioScience**, v. 62, n. 1, p. 39-45, 2012.

GANEM, R.S. **Conservação da biodiversidade: legislação e políticas públicas** (org.) Brasília: Câmara dos Deputados, Edições Câmara, 2010. 437 p. (Série memória e análise de leis; n. 2).

GHARBAWI, W. Molecular Genetics Characterization of *Plectropomus areolatus* Samples Collected from Jeddah Coast Using ISSR Analysis. **World Applied Sciences Journal**, Vol., 33 (4): 536-541, 2015.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C.M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v.122, p.81-89, 2001.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B. K.; LANDRUM, L. R.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F. F.; NIC LUGHADHA, E.; PROENÇA, C. E. B.; SILVA, L. H. S.; WILSON, P.G. e LUCAS, E. J. **Word checklist of Myrtaceae**. Royal Botanic Gardens, 2008.

GRATTAPAGLIA, D. et al. Progress in Myrtaceae genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. **Tree Genetics & Genomes**, v. 8, n. 3, p. 463-508, 2012.

GRESSLER, E. **Floracão e frutificação de Myrtaceae de Floresta Atlântica: limitações ecológicas e filogenéticas**. Dissertação de Mestrado. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista, 2005.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**. São Paulo, v. 29, n. 4, p. 509-530, Dez, 2006.

GUILHERME, F. A. G., MORELLATO, L. P. C., e ASSIS, M. A. Estruturas horizontal e vertical do componente arbóreo em floresta atlântica baixo-montana no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n.4, 725-737, 2004.

JESUS, J. B.; GAMA, D. C.; FERNANDES, M. M. Estudo da distribuição do bioma Mata Atlântica no Estado de Sergipe. In: VIII Simpósio Brasileiro de Pós-Graduação em Ciências Florestais, 2014, Recife. **Anais VIII Simpósio Brasileiro de Pós-Graduação em Ciências Florestais**, p 553-556, 2014.

- JIMENEZ, H. J.; MARTINS, L.S.S.; MONTARROYOS, A.V.V.; SILVA JÚNIOR, J.F.; ALZATE-MARIN, A.L.; MORAES FILHO, R.M. Genetic diversity of the Neotropical tree *Hancornia speciosa* Gomes in natural populations in Northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**. v. 14, p. 17749-17757, 2015.
- JOPPA, L. N.; ROBERTS, D. L.; MYERS, N.; PIMM, S. L. Biodiversity hotspots house most undiscovered plant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 32, p. 13171-13176, 2011.
- LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v. 49, n. 4, p. 508-536, 1997.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**. 3. ed. São Paulo: Plantarum, 2000, v.1, p.264.
- LORENZONI, R. M.; SOARES, T. C. B.; SANTIAGO, F. S.; SILVA, J. A.; COELHO, R. I. Utilização de marcadores ISSR na avaliação da divergência genética entre acessos de biribazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 36, n. spe1, p. 251-257, 2014.
- LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, v. 3, p. 91-99. 1994.
- MABBERLEY, D. J. **The Plant-book: A Portable Dictionary of the Vascular Plants**. Second Edition. 1997.
- MACHADO, A. B. M.; MARTINS, C. S.; DRUMMOND, G. M. Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção: incluindo a lista das espécies quase ameaçadas e deficientes em dados. **Biodiversitas**, 2005.
- MAGUIRE, T.L.; PEAKALL, R.; SAENGER, P. Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 388-398. 2002.
- MANI, A.; MISHRA, R.; THOMAS, G. Elucidation of diversity among psidium species using morphological and SPAR methods. **Journal of Phytology**, Allahabad, v.3, n.8, p.53-61, 2011.
- MARCHIORI, J. N. C. & SOBRAL, M. **Dendrologia das angiospermas - Myrtales**. Editora da UFSM, Santa Maria, 1997.
- MARTINELLI, G. & MORAES, M. A. **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. 1. ed. - Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 1100 p, 2013.
- MÉLO, D. L. F. **Potencial biotecnológico do umbu: perspectivas para o semi-árido**. 2005. 82 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2005.
- MITTERMEIER e SCARANO. Ameaças globais à biodiversidade de plantas. In: MARTINELLI, G. e MORAES, M. A. **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. 1. ed. - Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013, 1100 p.
- MOHAMMAD, S. A.; PRASANNA, B. M. Analysis of genetic diversity in crop plants- Salient statistical tools and considerations. **Crop Science**, Madison, v.43, p.1235-1248, 2003.

MORELLATO, L. P. C. & HADDAD, C. F. B. Introdução: A Mata Atlântica Brasileira. **Biotropica**, v. 32, n. 4, p. 786-792, 2000.

NASS, L. L. (ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, DF. p. 745-749. 2007.

NUNES, C. F.; FERREIRA, J. L.; GENEROSO, A. L.; DIAS, M. S. C.; PASQUAL, M.; CANÇADO, G. M. DE A. Diversidade genética de híbridos de morango (*Fragaria ananassa* Duch.) baseado em marcadores ISSR. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 35, n. 4, p. 443-452, Dec. 2013.

OLIVEIRA, M. G., OLIVEIRA, J. G., FILHO, A. G., PEREIRA, M. G., VIANA, A. P., FILHO, G. A. S., LOPES, G. E. M. Diversidade genética de aceroleiras (*Malpighia emarginata* D.C.), utilizando marcadores moleculares RAPD e características morfoagronômicas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.31, n.1, 162-170, 2009.

OLIVEIRA, N. N. S. de, VIANA, A. P., QUINTAL, S. S. R., PAIVA, C. L., e MARINHO, C. S. Análise de distância genética entre acessos do gênero *psidium* via marcadores issr. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 4, p. 917-923, dez. 2014.

PÁDUA, J. G.; FERREIRA, F. R. Recursos genéticos de fruteiras. In: BRUCKNER, C. H. (Ed.). **Fundamentos do melhoramento de fruteiras**. Viçosa: Editora UFV, 2008, p. 39-68.

PAGE, R.D.M. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, v.12, p.357-358, 1996.

PAVLICEK, A.; HRDA, S.; FLEGR, J. 1999. Free tree - Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. *Folia Biologica* 45: 97-99.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v.6, p.288-295, 2006.

PIMENTEL, V.; VIEIRA, V.; MITIDIERI, T.; FRANÇA, F.; PIERONI, J. P. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança?. *Revista do BNDES*, Rio de Janeiro, n.43, p. 41-89, 2015.

PIMM, S. L., JENKINS, C. N., ABELL, R., BROOKS, T. M., GITTLEMAN, J. L., JOPPA, L. N., RAVEN, P. H. ROBERTS, C. M.; SEXTON, J. O. The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. **Science** 344, 1246752, 2014.

PINHEIRO, L. R.; ALMEIDA, C. S.; SILVA, A. V. C. Diversidade genética de uma população natural de cambuizeiro e avaliação pós-colheita de seus frutos. **Scientia Plena**, v.7, n.6, p. 1-5, 2011.

PROENÇA, C.; VILLARROEL, D.; LUCAS, E.; FARIA, J. E. Q. DE; GOMES-BEZERRA, K. M.; SOARES-SILVA, L. H.; SOUZA, M. C.; OLIVEIRA, M. I. U.; ROSA, P. O.; MAURENZA, D.; KUTSCHENKO, D. C.; SFAIR, J. C.; MONTEIRO, P. N.; PRIETO, P. V. Myrtaceae. In: MARTINELLI, G. & MORAES, M. A. **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. 1. ed. - Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 1100 p, 2013.

- RABBANI, A. R. C.; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R. A. Variabilidade genética de *Genipa americana* L. pertencente ao baixo curso do rio São Francisco. **Revista Árvore**, v. 36, n. 3, p. 401-409, 2012.
- RAI, M. K.; PHULWARIA, M.; HARISH; GUPTA, A. K.; SHEKHAWAT, N. S.; JAISWAL, U. Genetic homogeneity of guava plants derived from somatic embryogenesis using SSR and ISSR markers. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. 111:259–264, 2012.
- RENAU-MORATA, B.; NEBAUER, S. G.; SALES, E.; ALLAINGUILLAUME, J.; CALIGARI, P.; SEGURA, J. Genetic diversity and structure of natural and managed populations of *Cedrus atlantica* (Pinaceae) assessed using random amplified polymorphic DNA. *Am. J. Bot.* 92, 875–884, 2005.
- ROCHA, A.; SALOMÃO, L. C. C.; SALOMÃO, T. M. F.; CRUZ, C. D.; SIQUEIRA, D. L. Genetic Diversity of ‘Ubá’ Mango Tree Using ISSR Markers. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v.50, n.2, p.108- 113, 2012.
- ROLIN, C. Pectin’s In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J.N. Industrial Gums: Polysaccharides and their derivatives. 3. ed. San Diego, EUA: Academic Press, p. 257-293, 1993.
- ROSSI, F. S., ROSSI, A. A. B., DARDENGO, J. D. F. E., BRAUWERS, L. R., DA SILVA, M. L., & SEBBENN, A. M. Diversidade genética em populações naturais de *Mauritia flexuosa* L. f.(Arecaceae) com uso de marcadores ISSR. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 42, n. 104, p. 631-639, dez. 2014.
- RYBKA A. C. P.; OLIVEIRA, E. A.; BIASOTO A. C. T. Elaboração de suco e geléia de cambuí (*Myrciaria tenella*). In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 9, Campinas. Anais... Campinas: UNICAMP/ FEA/SLACA, 2011.
- SANTANA, I. B. B.; OLIVEIRA, E. J. DE; SOARES FILHO, W. S.; RITZINGER, R.; AMORIM, E. P.; COSTA, M. A. P. C.; MOREIRA, R. F. C. Variabilidade genética entre acessos de Umu-Cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 868-876, Sept. 2011.
- SILVA, A. V. C. DA; FREIRE, K. C. S.; LÉDO, A. S.; RABBANI, A. R. C. Diversidade e estrutura genética de acessos brasileiros de jenipapo (*Genipa americana* L.). **Scientia Agricola**. Piracicaba, v. 71, n. 5, p. 387-393, Oct. 2014.
- SILVA, A. V. C.; RABBANI, A. R. C.; COSTA, T. S.; CLIVATI, D. Biometria de frutos e sementes de cambuí (*Myrciaria tenella* O. Berg). **Revista Agro@ mbiente On-line**, v. 6, n. 3, p. 258-262, 2012.
- SILVA, A.V.C.; RABBANI, A. R. C.; ALMEIDA, C. S.; CLIVATI, D. Genetic structure and diversity of the neem germplasm bank from Brazil northeast. **African Journal of Biotechnology**. 12: 2822-2829, 2013.
- SILVA, B. M., ROSSI, A. A. B., DARDENGO, J. D. F. E., DE ARAUJO, V. A. A. C., ROSSI, F. S., de OLIVEIRA, L. O., & CLARINDO, W. R. Diversidade genética estimada com marcadores entre sequências simples repetidas em cultivos comerciais de Cupuaçuzeiro. **Ciência Rural**, v. 46, n. 1, p. 108-113, 2016.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. Myrtaceae. In: FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M.; CARVALHO JR., A. A.; COSTA, A.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; MAIA, L.C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; COELHO, M. A. N.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L.P.; SOUZA V. C.; STEHMANN, J. R.; SYLVESTRE, L.S.; WALTER, B. M. T; ZAPPI, D. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: Andrea Jakobsson Estúdio/ Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010, p. 1326.

SOUZA, V. C., LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado no APG II**. São Paulo, Plantarum. 704 p. 2008.