



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS**  
**VEGETAIS**



**VIVIANE NUNES DOS SANTOS**

**ANÁLISE DE PATERNIDADE EM POLICRUZAMENTOS E**  
**DIVERGÊNCIA GENÉTICA DE *Spondias tuberosa* Arruda**  
**COM BASE EM LOCOS MICROSSATÉLITES**

Feira de Santana- BA

2020

**Viviane Nunes dos Santos**

**ANÁLISE DE PATERNIDADE EM POLICRUZAMENTOS E  
DIVERGÊNCIA GENÉTICA DE *Spondias tuberosa* Arruda  
COM BASE EM LOCOS MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Antônio Fernandes Santos

Feira de Santana- BA

2020

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

S239 Santos, Viviane Nunes dos

Análise de paternidade em policruzamentos e divergência genética em *Spondias tuberosa* Arruda com base em locos microssatélites / Viviane Nunes dos Santos. – 2020.

84 f.: il.

Orientador: Carlos Antonio Fernandes Santos.

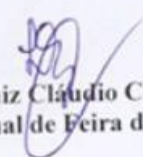
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Feira de Santana, 2020.

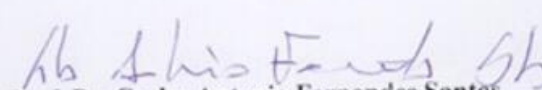
1. Umbuzeiro. 2. *Spondias tuberosa* Arruda. 3. Melhoramento genético.  
4. Genética populacional. 5. SSR. 6. Parentesco. I. Título. II. Santos, Carlos Antonio Fernandes, orient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana.

CDU: 581.4

**BANCA EXAMINADORA**

  
**Prof. Dr. Fabricio Francisco Santos da Silva**  
(NEMA – Núcleo de Ecologia e Monitoramento Ambiental)

  
**Prof. Dr. Luiz Cláudio Costa Silva**  
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)

  
**Prof. Dr. Carlos Antonio Fernandes Santos**  
(EMBRAPA SEMIÁRIDO)  
Orientador e Presidente da Banca

**Feira de Santana – BA**  
**2020**

*As minhas amadas  
Matilde, Sophia  
e Cecilia,  
dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, fonte da minha força nos dias mais difíceis. Grandioso és tu, suas palavras não voltam atrás, suas promessas não falham.

A minha mãe e sobrinhas, pelos sorrisos, amor, por serem minha estrutura e a motivação para persistir nesse caminho.

Ao meu pai e irmãos pela força e apoio, em especial a minha irmã Mariana, que sempre esteve presente e de prontidão quando precisei.

As minhas amigas, Darlete, Isobel, Raquel, Ivaneide, Valéria, Geusa, Maydara, que estiveram sempre ao meu lado, aconselhando-me quando precisei, obrigada pela amizade. E aos colegas que no meio dessa jornada tornaram-se grandes amigos, Antônio, Silvia, Cristina, Mariane, Williano e Carlos.

A Deisy, Itala, por todos os conhecimentos e iniciação as técnicas de biologia molecular, muito obrigada e a Tiago e Fabricio pela grande ajuda em momentos de difícil compreensão do estudo.

Ao meu orientador, pela oportunidade de partilhar seus conhecimentos, pelo trabalho que desenvolvemos e por contribuir para que eu me torne uma melhor profissional.

As “meninas da limpeza”, pela simpatia e cordialidade. E todos que porventura não tenha citado, mas saibam que no mínimo que tenha ajudado, sou imensamente grata.

A Embrapa Semiárido, pelas instalações e todo o material necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

A UEFS, todos os professores, pelo conhecimento obtido, aos funcionários do programa, em especial a Alberto e Lia, que sempre estiveram à disposição para sanar todas as dúvidas em relação ao programa.

Ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais (PPGRGV) e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*Don't only practice your art, but force  
your way into its secrets, for it and  
knowledge can raise men to the divine.*

*Ludwig van Beethoven*

## RESUMO

A utilização dos marcadores moleculares na agricultura permitiu grandes avanços nos estudos genéticos e conseqüentemente o melhoramento de plantas. O umbuzeiro está ainda na fase do pré-melhoramento e muitas técnicas moleculares são pouco utilizadas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver, transferir e ajustar reações com marcadores microssatélites para estudos de genética populacional e apoio em atividades de melhoramento no umbuzeiro. Foram desenvolvidos 14 locos microssatélites para umbuzeiro, avaliada a transferibilidade de outros 15 locos de *Spondias radlkoferi* e avaliados seis específicos para a espécie em oito acessos em policruzamentos. Dos 14 pares de primers desenhados, seis amplificaram, e apenas dois apresentaram polimorfismo. Todos os locos SSR de *S. radlkoferi* foram transferidos para o umbuzeiro, entretanto, apenas quatro foram polimórficos. Entre os seis locos SSR específicos da espécie todos apresentaram boa resolução em géis. No total foram identificados 12 locos SSR, com conteúdo de polimorfismo de informação variando de 0,195 a 0,744 e heterozigosidade esperada e observada de 0,233 a 0,825 e 0,250 a 0,750, respectivamente, sendo indicados para estudos de genética populacional e melhoramento da espécie. Os locos microssatélites permitiram identificar 85% dos parentais masculinos das progênies do BGU30 e 32% das progênies do BGU37, indicando que o policruzamento é uma alternativa para a obtenção de híbridos em umbuzeiro. Foram obtidas progênies resultantes do cruzamento dos BGUs 68, 44 e 48 com o BGU 30, inéditos e de grande interesse para o melhoramento da espécie. O coeficiente de similaridade entre os 24 acessos variou de 0,30 a 0,84 indicando grande divergência entre os acessos. A análise bayesiana sugere duas subpopulações, uma formada pela região de Januária e a outra pelas regiões de Juazeiro, Uauá e Petrolina. O valor de  $F_{ST}$  de 0,12 da análise molecular de variância indica moderada diferenciação genética entre as populações, sugerindo que a variabilidade genética das populações de umbuzeiro está moderadamente estruturada em função da procedência. As análises indicam que a diversidade genética do umbuzeiro não está uniformemente distribuída nas regiões estudadas, sendo recomendado a coleta de germoplasma de maior número de populações para ampliar diversidade genética da espécie.



**Palavras- chave:** Umbuzeiro, SSR, parentesco, estrutura genética, híbridos, melhoramento.

## ABSTRACT

The use of molecular markers in agriculture allowed great advances in genetic studies and, consequently, the improvement of plants. Umbuzeiro is still in the pre-breeding phase and many molecular techniques are little used. The objective of this work was to develop, transfer and adjust reactions with microsatellite markers for studies of population genetics and support in breeding activities in umbuzeiro. 14 microsatellite loci for umbuzeiro were developed, the transferability of another 15 loci of *Spondias radlkoferi* was evaluated and six species-specific were evaluated in eight crossroads. Of the 14 pairs of primers designed, six amplified, and only two showed polymorphism. All SSR loci of *S. radlkoferi* were transferred to umbuzeiro, however, only four were polymorphic. Among the six species-specific SSR loci, all showed good resolution in gels. In total, 12 SSR loci were identified, with content of information polymorphism ranging from 0.195 to 0.744 and expected and observed heterozygosity from 0.233 to 0.825 and 0.250 to 0.750, respectively, being indicated for studies of population genetics and species improvement. The microsatellite loci allowed to identify 85% of the male parents of the progenies of BGU30 and 32% of the progenies of BGU37, indicating that cross-breeding is an alternative for obtaining hybrids in umbuzeiro. Progenies were obtained resulting from the crossing of BGUs 68, 44 and 48 with BGU 30, unprecedented and of great interest for the improvement of the species. The similarity coefficient between the 24 accessions varied from 0.30 to 0.84, indicating a great divergence between the accessions. The Bayesian analysis suggests two subpopulations, one formed by the Januária region and the other by the Juazeiro, Uauá and Petrolina regions. The  $F_{ST}$  value of 0.12 in the molecular analysis of variance indicates moderate genetic differentiation between populations, suggesting that the genetic variability of umbuzeiro populations is moderately structured according to origin. The analyzes indicate that the umbuzeiro's genetic diversity is not evenly distributed in the studied regions, being recommended the collection of germplasm from a larger number of populations to increase the genetic diversity of the species.

**Keywords:** Umbuzeiro, SSR, kinship, genetic structure, hybrids, breeding.

## LISTA DE TABELAS

### REFERÊNCIAL TEÓRICO

**Tabela 1.** Classificação de marcadores microssatélites e número de variáveis (n). (Adaptado de Kalia et al. 2010).....26

**Tabela 2.** Genótipos dos genitores, possíveis genótipos da sua descendência e genótipos excluídos.....29

### CAPÍTULO I

**Tabela 1.** Sequências de primers forward (F) e reverse (R) desenhados para *Spondias tuberosa* Arr, com suas respectivas temperaturas de anelamento ( $T_m$ ), motivo de repetição (MT) e número de alelos (NA).....42

**Tabela 2.** Tamanho de bandas (TB), número de alelos (NA), heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) de dois locos microssatélites polimórficos desenvolvidos para *Spondias tuberosa*, avaliado em oito indivíduos do BGU da Embrapa Semiárido....43

**Tabela 3.** Temperaturas de anelamento ( $T_m$ ), número de alelos (NA) e tamanho de bandas (TB), heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) de locos microssatélites polimórficos avaliados e transferidos de *S. radlkoferi* para *S. tuberosa*.....44

**Tabela 4.** Temperaturas de anelamento ( $T_m$ ), número de alelos (NA) e tamanho de bandas (TB), heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) de locos microssatélites de *S. tuberosa*.....46

### CAPÍTULO II

**Tabela 1.** Temperaturas de anelamento ( $T_m$ ), número de alelos (NA) e tamanho de bandas (TB), Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e Heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e Conteúdo de informação polimórfica (PIC) de locos microssatélites de *Spondias tuberosa*.....55

**Tabela 2.** Progênies da planta maternal BGU 30 e provável progenitor masculino, em esquema de policruzamentos de acessos de umbuzeiro.....59

**Tabela 3.** Progênies da planta maternal BGU 37 e provável progenitor masculino, em esquema de policruzamentos de acessos de umbuzeiro.....59

### **CAPÍTULO III**

**Tabela 1.** Identificação, procedência, latitude e longitude de acessos no Banco de Germoplasma de Umbuzeiro da Embrapa Semiárido. ....67

**Tabela 2.** Temperatura de anelamento ( $T_m$ ), Número de alelos (NA) e tamanho de bandas (TB), Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), Heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e Conteúdo de informação polimórfica (PIC) de dez locos microssatélites avaliados em 24 indivíduos de *Spondias tuberosa* Arruda.....71

**Tabela 3.** Análise de variância molecular (AMOVA) e fluxo gênico estimado ( $N_m$ ) nas populações de umbuzeiro, calculadas pelo método de Wright <sup>(1949)</sup>.....76

## LISTA DE FIGURAS

### REFERÊNCIAL TEÓRICO

- Figura 1.** Locais de ocorrência confirmada do umbuzeiro. Fonte: Flora do Brasil....18
- Figura 2.** (A) Inflorescência do umbuzeiro; (B) Frutos; (C) Planta adulta; (D) Raízes tuberosas na fase de muda. Fonte: a autora.....20

### CAPÍTULO I

- Figura 1.** Amplificação de oito locos de SSR, desenvolvidos através de bibliotecas enriquecidas com sequências repetidas e avaliados em cinco acessos do BAG de Umbuzeiro.....43

### CAPÍTULO II

- Figura 1.** Croqui e imagem da área de coleta de amostra dos parentais: umbu comum, BGU30, BGU37, BGU44, BGU48, BGU52, BGU55 e BGU68. Sementes foram coletadas para avaliação das progênies nos acessos BGU 30 e BGU37.....52
- Figura 2.** Dendrograma representativo da divergência genética entre os oito acessos de umbuzeiro (*S.tuberosa*), obtido pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), utilizando o complemento aritmético do índice de Jaccard como medida de dissimilaridade, com base em marcadores SSR (Simple Sequence Repeats). Valor cofenético = 0,85.....57

### CAPÍTULO III

- Figura 1.** Dendrograma representativo da divergência genética entre os 24 acessos de *Spondias tuberosa*, obtido pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), utilizando o complemento aritmético do índice de Jaccard como medida de dissimilaridade, com base em marcadores SSR (Simple Sequence Repeats). Valor cofenético = 1,0.....74
- Figura 2.** Delta K, calculado com a taxa média de variação de segunda ordem da probabilidade de K dividido pelo desvio padrão da probabilidade K.....75
- Figura 3.** Estrutura genética de 24 acessos de umbuzeiro, de quatro regiões, gerados com base em análises bayesianas, considerando K = 2, obtido pelo método  $\Delta K$ , a partir de 20 simulações independentes para cada número de agrupamentos possíveis (k).....76

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>15</b>
1.1 Objetivo Geral.....	17
1.2 Objetivos Específicos.....	17
<b>2. REFERÊNCIAL TEÓRICO</b>	
2.1 <i>Spondias tuberosa</i> Arruda.....	18
2.1.1 Aspectos econômicos.....	21
2.2 Divergência genética.....	22
2.3 Marcadores Moleculares, desenvolvimento e transferibilidade.....	24
2.4 Policruzamentos e Paternidade.....	27
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	
<b>3. CAPÍTULO I - DESENVOLVIMENTO, TRANSFERIBILIDADE E AVALIAÇÃO DE MICROSSATÉLITES EM <i>Spondias tuberosa</i> Arruda, ESPÉCIE ENDÊMICA DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO.....</b>	<b>36</b>
3.1 INTRODUÇÃO.....	38
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.4 CONCLUSÃO.....	46
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	
<b>4. CAPÍTULO II - ANÁLISE DE PATERNIDADE EM POLICRUZAMENTOS DE <i>Spondias tuberosa</i> Arruda COM BASE EM LOCOS MICROSSATELITES..</b>	<b>49</b>
4.1 INTRODUÇÃO.....	51
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	52
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.4 CONCLUSÃO.....	60
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	
<b>5. CAPÍTULO III- DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM UMBUZEIRO BASEADOS EM LOCOS MICROSSATÉLITES.....</b>	<b>64</b>
5.1 INTRODUÇÃO.....	66
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	67
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	70
5.4 CONCLUSÕES.....	77
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	

## ANEXOS

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Semiárido brasileiro, com área de 980.133,079 km<sup>2</sup>, abrange grande parte dos Estados da região nordeste do país, fração esta que equivale a 56,46% da região (MEDEIROS, 2012). Destaca-se pelas suas características climáticas, como baixa pluviosidade, com médias anuais inferiores a 800 mm e umidade relativa do ar em torno de 50% (MOURA, 2007). Entretanto, apesar da limitação hídrica esta região apresenta uma grande diversidade em sua flora, que tem maior parte de seu território ocupado pela Caatinga, nome dado ao bioma caracterizado por apresentar vegetação adaptada às condições de aridez e de fisionomia variada (SILVA et al., 2010).

Dentre as espécies que compõe a flora da caatinga, o umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda – Anacardiaceae), espécie nativa do Semiárido, é uma das plantas de maior representatividade para a região e é considerada como a árvore sagrada do sertão, por apresentar características de resistência aos períodos de seca. É uma árvore que está presente em toda região Semiárida, sendo seu extrativismo praticado nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Bahia e na parte Semiárida de Minas Gerais e partes do Maranhão (OLIVEIRA et al. 2018).

O umbuzeiro é uma planta alógama, diploide  $2n=32$ , de porte arbóreo, podendo chegar até 6 m de altura e 15 m de diâmetro de copa. Seus ramos são entrelaçados e abundantes e seus frutos são do tipo drupa. É altamente produtiva e bem adaptada a solos rasos e secos. Seu sistema radicular apresenta xilopódios, local de reserva de água e nutrientes, que mantem a planta durante períodos da seca (MACHADO et al., 2006; ALMEIDA, et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2018; GOMES, 1965; DUQUE, 1980)

A exploração do umbuzeiro ainda é praticada de forma extrativista por agricultores familiares. A coleta e a comercialização dos frutos do umbuzeiro caracteriza-se como uma oportunidade de negócio nos períodos da safra que gera retorno econômico. No entanto, a sazonalidade e alto grau de perecibilidade, devido à falta de estrutura para armazenamento dos frutos, levam a muitas perdas (CONAB, 2017). A falta de estudos para intensificar a importância e potencial produtivo desta espécie tornam-se um agente limitador para o desenvolvimento comercial do umbuzeiro.

Os trabalhos de recursos genéticos são ainda muito limitados e sendo o umbuzeiro uma cultura de interesse imediato para o Semiárido brasileiro, a exploração desenfreada e inadequada pode ocasionar em perda de variabilidade genética, impedindo a conservação da espécie no futuro. Trabalhos básicos, como o desenvolvimento de marcadores codominantes, como microssatélites ou 'single sequence repeats' (SSR), tem sido pouco reportado. Destes poucos trabalhos Balbino et al. (2019) desenvolveram 18 locos de SSRs polimórficos utilizando seqüências de sequenciamento de alto rendimento e um método de enriquecimento de esferas magnéticas em umbuzeiro.

Os marcadores SSRs apresentam um grande conteúdo informativo, pois são multialélicos e permitem a diferenciação entre indivíduos homozigotos e heterozigotos, por isso são considerados marcadores codominantes (TURCHETTO-ZOLET, 2017). São importantes ferramentas para estudos de genética de população, que são fundamentais para trabalhos de recursos genéticos, visando à sua preservação e utilização em programas de melhoramento da espécie.

Uma estratégia adotada com sucesso entre espécies do mesmo gênero, quando esse tipo de marcador não foi desenvolvido ou existe em pouca quantidade para a espécie de interesse, como é o caso do umbuzeiro, é a transferibilidade. Técnica que tem sido reportada com sucesso, por exemplo, entre quatro espécies de *Eugenia* (RAMOS et al., 2014) e entre espécies de *Myrtaceae* (RAY et al., 2013). Aguilar-Barajas et al. (2014) desenvolveram e publicaram 14 'primers' de SSR para *S. radlkoferi*, dos quais 12 amplificaram produtos de DNA em *S. mombim*, indicando alta probabilidade de transferibilidade para outras espécies do gênero, como *S. tuberosa*. A transferibilidade de marcadores SSRs para o umbuzeiro, além de reduzir tempo e economizar recursos financeiros, possibilitará trabalhos de genética populacional mais refinados e precisos, como os propostos neste trabalho.

O conhecimento sobre a variabilidade genética do umbuzeiro pode auxiliar os programas de melhoramento genético a adotar as melhores metodologias, além na seleção de genótipos superiores atrativos ao mercado, obtendo frutos com qualidade superior que é bastante requerido pelos consumidores. Diante da relevância e potencial desta fruteira como recurso genético, é de grande importância a conservação da variabilidade genética para assegurar sua melhor exploração.



O umbuzeiro está ainda na fase do pré-melhoramento, pois não existem protocolos para cruzamentos manuais e progênies resultantes de cruzamentos de acessos superiores, que resultem no desenvolvimento de novas cultivares. Para superar essas limitações, a obtenção de híbridos resultantes de cruzamentos naturais, em esquema de policruzamentos, é uma estratégia a ser adotada na espécie. Sendo uma espécie preferencialmente de polinização cruzada (SANTOS e GAMA, 2013) a estratégia de policruzamentos, seguida da identificação dos possíveis parentais masculinos, poderá contribuir para o estabelecimento de programa de melhoramento do umbuzeiro.

### **1.1 Objetivo Geral**

Desenvolver, transferir e ajustar reações com marcadores microssatélites para estudos de genética populacional e apoio em atividades de melhoramento no umbuzeiro.

### **1.2 Objetivos Específicos**

- 1.2.1** Avaliar e transferir locos de SSR para *S. tuberosa*;
- 1.2.2** Identificar parentais de híbridos em policruzamentos entre acessos para estabelecimento de programa de melhoramento da espécie.
- 1.2.3** Estimar a divergência genética em acessos do banco ativo de germoplasma (BAG) de umbuzeiro;

## 2. REFERENCIAL TEORICO

### 2.1 *Spondias tuberosa* Arruda

O umbuzeiro é uma planta que tem sua distribuição natural na vegetação árida da Caatinga do Nordeste do Brasil (MITCHELL e DALY, 2015), seu nome é originado do tupi guarani “y-mb-u” que significa “arvore que dá de beber”. Consagrada como a árvore sagrada do sertão, esta espécie apresenta um grande apelo social e é considerada como um símbolo de resistência, por ser uma planta xerófila, apresentando em suas raízes xilopódios que armazenam água, que permitem resistir a longos períodos de estiagem (DUQUE, 1980).

O domínio fitogeográfico do umbuzeiro encontra-se distribuído nos biomas Caatinga e Cerrado (FLORA DO BRASIL, 2017). De acordo com Duque (1980) esta espécie ocorre em áreas que apresentam precipitações entre 400 e 800 mm, temperaturas que variam de 13°C a 38°C, umidade relativa entre 30% e 80% e insolação entre 2.000 a 3.000 horas ao ano. Apesar de ser encontrada em parte da região sudeste, o umbuzeiro ocorre preferencialmente na região Semiárida (OLIVEIRA, et al., 2018).



**Figura 1.** Locais de ocorrência confirmada do umbuzeiro. Fonte: Flora do Brasil.

A *S. tuberosa* pertence à família *Anacardiaceae* (PELL et al. 2011) e ao gênero *Spondias* que possui 18 espécies, das quais seis ocorrem no Nordeste de forma

espontânea ou subespontânea: cajazeira (*S. lutea* L.), cerigueleira (*S. purpurea* L.), cajá-mangueira ou cajaraneira (*S. cytherea* Sonn.), umbuguela (*Spondias* sp.), umbucajazeira (*Spondias* sp.) e umbuzeiro (*S. tuberosa*) (PIRES, 1990), sendo essa última de maior representatividade na região Nordeste.

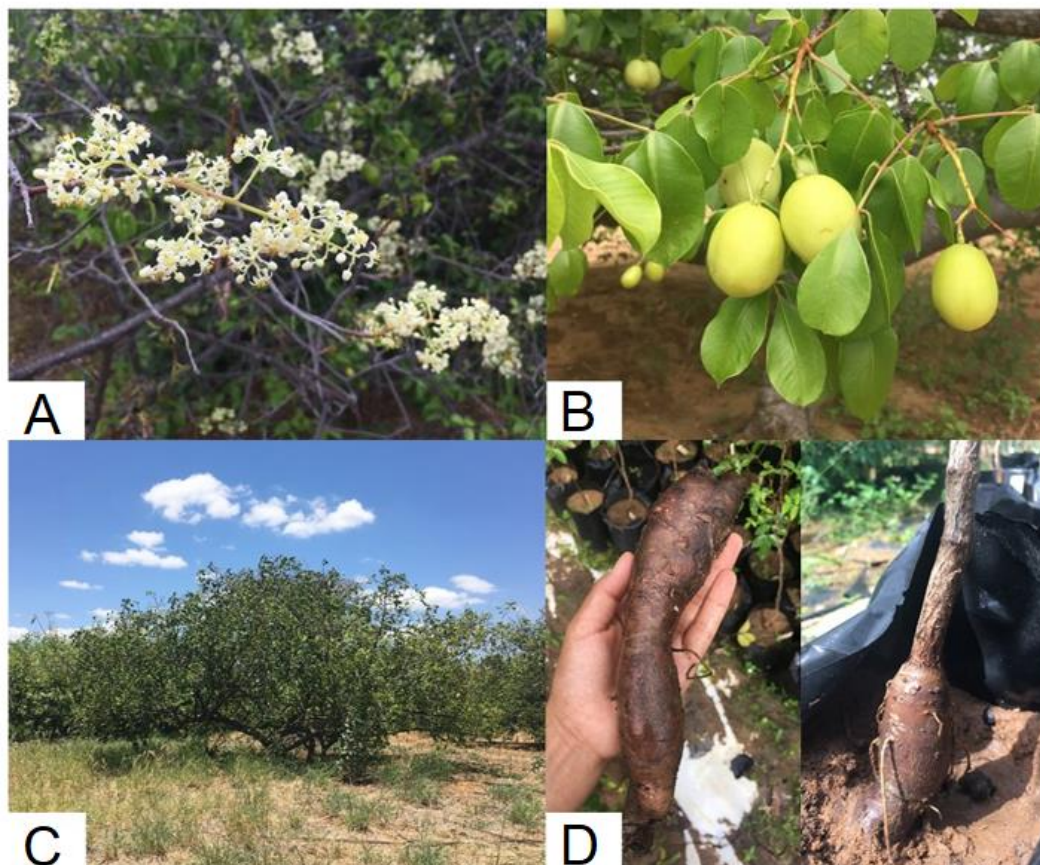
Segundo Almeida et al. (2007), o umbuzeiro é uma espécie diploide  $2n=32$ . Apresenta fecundação cruzada, andromonóica, ou seja, alógama (MACHADO et al., 2006). Santos (1997), ao avaliar 340 árvores do umbuzeiro em seu hábitat natural em 17 regiões ecogeográficas concluiu que o padrão fenotípico do umbuzeiro é constituído por árvores com altura de 6,3 m, seis ramos principais, copa arredondada de 11 m de diâmetro, fruto com peso de 18,4 g, teor de sólidos solúveis totais na polpa de 12°brix, peso da polpa de 10,7 g e reação polpa/fruto de 0,58.

Suas folhas apresentam em média 8 a 13 cm de comprimento, são alternas, compostas, com 3 a 7 folíolos, com bordas inteiras, com aproximadamente 4 cm de comprimento e 2 cm de largura (OLIVEIRA, et al. 2018). Suas raízes são longas, podendo chegar até 1,5 m de comprimento, sendo a presença dos xilopódios uma característica marcante no sistema radicular, assegurando sua sobrevivência nos períodos de estiagem, pois armazenam água, mucilagens, glucose, taninos, mantendo a planta nutrida (CAVALCANTI e RESENDE, 2006; DUQUE, 1980). (Figura 2).

A floração do umbuzeiro pode variar de acordo com a região, geralmente está associada ao início das chuvas na região Semiárida e logo ao final do período de estiagem (NADIA et al., 2007). No sertão pernambucano esse período corresponde aos meses entre outubro e dezembro, já na região do Agreste, ocorre entre janeiro e março (PIRES, 1990). Segundo Barbosa et al. (2003), essas variações das épocas de floração podem estar associadas à duração e intensidade do déficit hídrico ocorridos no período de estiagem.

Os frutos são do tipo drupa, com um comprimento de 2 a 3,5 cm e podem pesar de 10 a 20 g (Figura 2). Seu formato é arredondado ou elíptico, casca coriácea a coloração é amarelo-esverdeada quando maduro (ANDERSEN e ANDERSEN, 1988). São considerados climatéricos, podendo amadurecer após a colheita, desde que tenham atingido a maturidade fisiológica (NEVES e CARVALHO, 2005). De acordo com Dantas Junior (2008) são ricos em vitamina C, flavonoides e outros compostos

fenólicos que contribuem para uma dieta saudável e ainda ação antioxidante. Estes frutos podem ser consumidos de forma *in natura*, ou industrializada, na forma de doces, geleias, sucos, néctares dentre outros preparos.



**Figura 2.** (A) Inflorescência do umbuzeiro; (B) Frutos; (C) Planta adulta; (D) Raízes tuberosas na fase de muda. Fonte: a autora.

A propagação do umbuzeiro pode ser realizada de forma sexuada ou assexuada. Normalmente é realizada de forma assexuada, ou seja, vegetativamente, por estaquia ou enxertia, pois a obtenção de mudas via sementes é demorada e desuniforme, o que não é interessante para cultivos comerciais (BATISTA, et al. 2015). A propagação por enxertia, além de proporcionar pomares uniformes, permite antecipar a produção. Segundo Nascimento et al. (1993), plantas oriundas de enxertia florescem e produzem no quarto ou quinto ano, após seu estabelecimento em campo.

### 2.1.1 Aspectos econômicos

Privilegiado pela sua grande extensão territorial e conseqüentemente uma diversidade em climas, o Brasil tem se destacado no agronegócio, setor que é um dos principais responsáveis por contribuir para a balança comercial do país, que em 2017 foi sozinho responsável por 21,6% do PIB (Produto interno bruto) (MAPA, 2019). Dentre os setores que compõe o agronegócio, a fruticultura tem sido uma atividade de grande aptidão para o Brasil o levando ao terceiro lugar no ranking mundial na produção de frutas (FAO, 2017).

A região Nordeste tem ganhado grande notoriedade no setor da fruticultura, em especial o polo irrigado do Submédio Vale do São Francisco. Outras frutíferas como goiaba, acerola, coco e banana também são produzidas na região. Os cultivos irrigados e as condições de insolação durante todo o ano, permitem até duas safras e meia em videiras, fatores que favorecem a implantação e consolidação dessa região como referência na produção de frutas (SÁ et al., 2015).

Entretanto, apesar da ascensão da fruticultura no agronegócio brasileiro, o potencial de fruteiras nativas acaba não sendo tão explorado, como é o caso do umbuzeiro, que é endêmico do Semiárido brasileiro, adaptado às condições climáticas e com grande potencial para uso industrial e para o consumo *in natura*. Sua produção ainda acontece de forma muito intimista quando comparada a fruteiras exóticas como é o caso da uva e da manga que juntas somaram em 2018, 2.911.282 toneladas produzidas e o umbuzeiro somente 7.765 toneladas da fruta (IBGE, 2018).

Alguns fatores, como sua distribuição geográfica concentrada na região Semiárida, a produção que é ainda realizada de forma extrativista (OLIVEIRA, et al. 2018), além dos poucos trabalhos voltados à espécie, como os relacionados ao plantio, conservação e enriquecimento da caatinga, com umbuzeiro são limitantes para o crescimento e difusão da cultura (BATISTA, 2015). Apesar disso, o umbuzeiro apresenta uma grande variabilidade genética (SANTOS, et al. 2011), o que implica dizer que os trabalhos de melhoramento genético são uma alternativa altamente viável para selecionar genótipos superiores com características muito apreciadas pelos consumidores e tornando-a ainda mais atrativa para o comércio frutícola.

Segundo dados do IBGE (2018), no Nordeste, o estado da Bahia é o maior produtor dos frutos do umbuzeiro, sendo responsável por cerca de 74% da produção nacional. Essa concentração de produção no Estado baiano está relacionada com cooperativas instaladas na região, que tem estimulado a produção e o extrativismo da fruta na região Semiárida, nestas unidades são produzidos subprodutos da fruta trazendo a centenas de famílias uma fonte de renda (CONAB, 2017).

A produção dos frutos do umbuzeiro ocorre nos períodos chuvosos na região Semiárida e a comercialização destes advém de coletas extrativistas. A comercialização dos frutos limitados pela sazonalidade do período de produção e a ausência de cultivo em pomares comerciais, acaba por não atender a alta demanda pelo fruto. O estabelecimento de pomares comerciais atrelados a trabalhos visando a seleção de plantas com qualidade superior, a fim de atender as demandas dos consumidores seriam alternativas para ressaltar o potencial econômico que esta planta oferece (BATISTA et al, 2015).

Mesmo diante da falta de incentivo à produção e dos poucos estudos relevantes para elevar o patamar no mercado das fruteiras, o umbuzeiro vem ao longo dos anos ganhando espaço no mercado, como uma fruta exótica, em muitos casos nem suprimindo a demanda do mercado (BATISTA et al, 2015). Considerando a grande relevância socioeconômica do umbuzeiro para a região Semiárida são imprescindíveis políticas públicas, incentivos e estudos voltados a essa espécie. Com seu sabor marcante e uma diversidade de possibilidades para fins agroindustriais, o umbuzeiro é uma planta que merece respaldo e atenção do mercado de frutíferas.

## **2.2 Diversidade genética**

A divergência genética pode ser entendida como as diferenças genéticas presentes para uma determinada espécie, podendo ocorrer dentro das populações, entre populações e entre espécies, sendo um importante requisito para a evolução das espécies, uma vez que a seleção natural só ocorre quando existe variabilidade para ser selecionada (JIMÉNEZ e COLLADA, 2000). Seu estudo pode ser de forma quantitativa ou preditiva. Dentre os métodos quantitativos, tem-se as análises dialélicas, onde é necessária avaliação dos genitores e suas respectivas combinações híbridas. Em relação aos métodos preditivos, estes se baseiam nas diferenças

morfológicas, fisiológicas ou moleculares, quantificando os genitores através das medidas de dissimilaridade a partir de suas diferenças (CRUZ e CARNEIRO, 2006).

A diversidade genética pode ser obtida a partir das frequências alélicas, importantes meios que permitem calcular as distâncias genéticas entre os indivíduos estudados. Ela pode ser mensurada de zero a um, quanto mais próxima de zero, menor a diferença, e quanto mais próxima de um, maior a diversidade genética (CRUZ et al. 2011).

Os parâmetros mais utilizados para descrever a diversidade genética populacional com dados provenientes de marcadores moleculares são: diversidade alélica, conteúdo de informação polimórfica (PIC), a heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) e a heterozigosidade observada ( $H_o$ ), onde a diversidade alélica é o número de alelos por locos; PIC a razão entre o número de locos polimórficos e o número total de locos analisados; a heterozigosidade esperada consiste na razão da frequência de heterozigotos para cada locos, pelo número total de locos e a heterozigosidade observada, é a razão de um determinado número de heterozigotos de um locos pelo total de indivíduos amostrados (NEI, 1987, FRANKHAM et al. 2002).

A diversidade genética tem grande relevância nos programas de melhoramento de plantas. O conhecimento sobre a variabilidade genética assegura trabalhos mais seguros, traçando um melhor caminho para manejar bancos de germoplasma, por exemplo, combinações híbridas altamente heteróticas, que exibem superioridade consistente, podem ser resultado da heterose, expressando vigor híbrido (HALLAUER e MIRANDA, 1988).

Estudos visando estimar a variabilidade genética em acessos de *S. tuberosa*, oriundos de diferentes locais, podem ser de grande importância para formar uma base para o programa de melhoramento genético da espécie. Onde será possível encontrar indivíduos com características promissoras que possam ser utilizadas para chegar em genótipos com maior produção, maior tamanho do fruto, maior teor de compostos bioativos, entres outros.

Alguns estudos com o gênero *Spondias* tem possibilitado para o entendimento parcial da sua diversidade genética. Gois et al. (2014) caracterizaram geneticamente, por meio de marcadores RAPD, 17 indivíduos de *S. lutea* L. (cajá), com a finalidade de elaborar estratégias de produção de sementes para a recuperação de mata ciliar

na região do Baixo São Francisco sergipano. Os marcadores utilizados foram suficientes para estimar a diversidade e todos os indivíduos analisados foram divergentes, podendo ser utilizados como matrizes porta-sementes em programas de produção de sementes.

Em umbu-cajazeira (*Spondias sp.*), Santana et al. (2011) estudaram a diversidade genética em 17 acessos da espécie, pela utilização de 25 marcadores ISSR, que produziram um total de 249 bandas, sendo 201 bandas polimórficas e 48 monomórficas, indicando um alto grau de polimorfismo desse marcador e sua eficiência no estudo. A partir das dissimilaridades observadas, com base no coeficiente de Jaccard, que variaram de 0,247 a 0,665, foi possível constatar uma considerável diversidade genética entre os indivíduos analisados.

Silva et al. (1987), ao caracterizarem frutos do umbuzeiro, encontraram grande variação fenotípica, concluindo que a espécie apresentava grande variabilidade. Santos et al. (2008), estudando a variabilidade genética do umbuzeiro, por meio de marcadores AFLP na região Semiárida, também encontraram alta variabilidade dentro de populações. A variabilidade genética é de suma relevância e deve ser estudada, visando não somente a exploração comercial, mas também a conservação da espécie.

Por ser considerada endêmica do Semiárido brasileiro, o umbuzeiro tem seu centro de diversidade no Nordeste/Caatinga, como descrito por Giacometti (1992), dessa forma é nessa região onde há um grande acervo de variabilidade genética para ser utilizada no desenvolvimento de programas de melhoramento para a espécie. Em um levantamento realizado por Ramos et al. (2008) de germoplasmas vegetais conservados no Nordeste brasileiro, foram constatados 80 acessos de umbuzeiro, que podem ser utilizados para o melhoramento da espécie, os quais encontram-se preservados no Banco Ativo de Germoplasma (BGU) da Embrapa Semiárido.

### **2.3 Marcadores Moleculares, desenvolvimento e transferibilidade**

Um marcador genético pode ser definido como a forma que os alelos em locos segregam de uma maneira mendeliana e é expressa num caráter que possa ser visto ou analisável. Eles podem ser de diferentes tipos como os morfológicos, bioquímicos, enzimáticos e os moleculares, que se caracterizam como um grande avanço no



campo da genética molecular (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). Os marcadores morfológicos foram os primeiros a serem utilizados, no entanto, devido ao seu baixo número de descritores ficaram limitados para o emprego nos programas de melhoramento genético (GRATTAPAGLIA e FERREIRA, 1998).

Com o surgimento da técnica da PCR (Reação em cadeia de polimerase), tornou-se possível o desenvolvimento de diferentes metodologias para analisar o DNA, permitindo a amplificação de uma grande quantidade de uma sequência específica de DNA sem necessidade de clonagem, começando com apenas algumas moléculas da sequência alvo (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). Dessa forma os marcadores moleculares ganharam espaço no campo da genética molecular, por apresentarem técnicas simples e rápidas, além de viabilizar a caracterização genética de grandes números de genótipos (BERED, 1997).

Os marcadores moleculares têm ampla aplicação, como em estudos de diversidade genética, paternidade, frequência gênica, filogenética, mapeamento genético, dentre outras aplicações (AMABILE et al., 2018). Atualmente, existe um grande número de marcadores moleculares, como: Isoenzimas, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), Microssatélites, Minissatélites, CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism), ISSR (inter Simple Sequence Repeats), PCR-sequencing, além de marcadores baseados em retrotransposons, marcadores baseados em genômica funcional e SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Suas aplicações dependem muito do objetivo do estudo, infraestrutura disponível, recursos financeiros, além de equipe técnica com treinamento apropriado (FALEIRO, 2007).

Dentre estes marcadores, os microssatélites tem sido amplamente utilizados, pois para cada loco de SSR tem-se grande conteúdo informativo, são multialélicos e permitem a diferenciação entre indivíduos homozigotos e heterozigotos, por isso são considerados marcadores codominantes, além de serem abundantes no genoma, fáceis de automatizar, robustos e reprodutíveis (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). Estes marcadores são repetições de um a seis nucleotídeos que se repetem em sequência (GRATTAPAGLIA e FERREIRA, 1998).

Os marcadores microssatélites podem ser desenvolvidos de diferentes formas, dentre estas destacam-se bibliotecas genômicas, bibliotecas de cDNA e através do sequenciamento (KANTETY et al., 2002). Sua classificação pode ser definida de diferentes formas, dependendo do tamanho, tipo de unidade de repetição e sua localização no genoma (Tabela 1). Mononucleotídeos quando há apenas um nucleotídeo ((G)n), no número de repetições; dinucleotídeos, dois nucleotídeos, ((GA)n), seguidos pelos trinucleotídeos ((GAT)n), tetranucleotídeos ((GATA)n), pentanucleotídeos ((GATAC)n) e hexanucleotídeos ((GATACA)n). Sua organização pode ser perfeita, quando não há nenhuma interrupção; imperfeita, quando ocorrem interrupções por uma base diferente nas sequências repetidas; interrompida, outra sequência interrompe o marcador e compostos, quando o marcador é formado por duas ou mais sequências; quanta a localização no genoma podem ser de origem nuclear, cloroplastidiais e mitocondriais (KALIA et al., 2010, TAUTZ, 1989; GOLDSTEIN e SCHLOTTERER, 1999).

**Tabela 1.** Classificação de marcadores microssatélites e número de variáveis (n). (Adaptado de Kalia et al. 2010).

<b>Baseado nos motivos de repetição do nucleotídeo</b>		
	<b>Exemplos</b>	
Mononucleotídeos	(A)n ...	AAAAAA
Dinucleotídeos	(CA)n	CACACACACA
Trinucleotídeos	(CGT)n	CGTCGTCGTCGT
Tetranucleotídeos	(CAGA)n	CAGACAGACAGA
Pentanucleotídeos	(AAATT)n	AAATTAATTAATTAATT
Hexanucleotídeos	(CTTTAA)n	CTTTAACTTTAACTTTAA
<b>Baseado no arranjo dos nucleotídeos nos motivos de repetição</b>		
Perfeito	(CA)n	
Imperfeita	((AAC)n ACT (AAC)n +1	
Interrompido	(CCA)n TT (CGA)n + 1	
Compostos	(CA)n (GA)n	
<b>Baseado na sua localização no genoma</b>		
Nuclear nuSSR		
Cloroplastidial cpSSR		

Para o gênero *Spondias*, poucos trabalhos têm sido realizados para desenvolver microssatélites. Aguilar-Barajas et al. (2014) desenvolveram e publicaram 14 primers SSR para *S. radlkoferi* a partir do DNA genômico de um único indivíduo de *S. radlkoferi*. Além destes locos, mais 18 específicos para *S. tuberosa* foram publicados de biblioteca genômica enriquecida (BALBINO et al, 2019).

Mesmo diante das inúmeras vantagens e aplicações dos marcadores SSR, vale ressaltar que o custo é elevado para o desenvolvimento desses marcadores, principalmente pela necessidade de isolar e desenvolver primers específicos para cada espécie a qual se queira estudar ou realizar testes de transferibilidade (TURCHETTO- ZOLET et al., 2017).

A transferibilidade de marcadores microssatélites consiste em utilizar primers já desenvolvidos para espécies do mesmo gênero ou até mesmo da família. Diversos trabalhos têm sido reportados com sucesso. Nogueira et al. (2015) transferiram 152 de 158 marcadores SSRs de *P. guajava* para pelo menos uma de 16 espécies do gênero *Eugenia*. Azevedo et al. (2018) também encontram altos percentuais de transferibilidade também foram observados no gênero *Euterpe*, onde houve 100% de transferibilidade de *Euterpe Edulis* para *E. precatória*. Em *Spondias*, Aguilar Bajaras (2014) transferiu 77,8% dos locos SSR desenvolvidos de *Spondias radlkoferi* para *S. mombin*.

## 2.4 Policruzamentos e paternidade

O sucesso de um programa de melhoramento genético de plantas está diretamente relacionado com variabilidade genética de plantas, sendo um fator decisivo para a obtenção de cultivares melhoradas. A variabilidade genética pode ser obtida através de acessos em bancos de germoplasma, mutações, transformação gênica, variação somaclonal ou cruzamentos, que tem como resultado a recombinação gênica a partir de diferentes genitores (BORÉM, 1998).

O cruzamento entre plantas pode ser biparental, quando o cruzamento é entre dois genitores, e em policruzamento, onde estão presentes diversos genitores cruzando entre si. O policruzamento é uma forma de aumentar a variabilidade genética, sendo esse método muito empregado em plantas alógamas, como forrageiras, batata doce e cana-de-açúcar, tendo como objetivo proporcionar uma oportunidade igual de cruzamento entre os genótipos envolvidos (BORÉM & CAVASSIM, 2009).

Poehlman e Sleper (1995) definem policruzamentos como 'melting-pot crosses' ou literalmente caldeirão com várias linhagens em cruzamento. Para esses autores, apenas a planta maternal da progênie é conhecida, podendo o pai ser qualquer uma das plantas do entorno. A identificação da planta paterna é possível com o uso de marcadores moleculares, como demonstrado por Tew & Pan (2010). A partir do policruzamento, ocorrem recombinações nos genótipos aumentando a possibilidade de seleção de novos genótipos superiores, pelo aumento da variabilidade genética e da possibilidade em que sejam transmitidos alelos de interesse (HITLLE, 1954).

Na realização de cruzamentos manuais para obtenção de híbridos é necessário que caracteres contrastantes nos parentais sejam identificados (como diferentes cores de flor, formato de folha, cor do talo, entre outras) para que híbridos possam ser declarados, sob pena de que o produto obtido seja resultante de autofecundação da planta maternal e não de cruzamento. Para espécies perenes como umbuzeiro, pouco estudada, essa situação com marcadores morfológicos é praticamente inviável para identificação de híbridos entre dois progenitores. Dessa forma, o uso de marcadores moleculares é fundamental para identificação de híbridos nessa espécie, excluindo-se os resultantes de autofecundação.

Em maracujazeiro, marcadores RAPD foram reportados como uma eficiente ferramenta para verificação da fecundação cruzada no gênero *Passiflora* ao serem utilizados para confirmação de paternidade em 15 híbridos interespecíficos artificiais no gênero *Passiflora*, no intuito de encontrar compatibilidade genética entre essas espécies para a aplicação no melhoramento genético (JUNQUEIRA et al. 2008).

Nandakumar et al. (2000) utilizaram 10 marcadores microssatélites para confirmar 11 híbridos de arroz, assim como determinar suas linhas parentais. A partir da utilização dos marcadores moleculares foi possível diferenciar todos os híbridos,

indicando que podem ser usados como marcadores de referência para a identificação e proteção desses híbridos.

Em um estudo realizado por Gerber et al. (2000), marcadores dominantes, como AFLPs, e codominantes, como os microssatélites, foram comparados quanto a seu poder de reconstrução de paternidade em 89 indivíduos de carvalho. Ambos marcadores demonstraram altas probabilidades de exclusão de paternidade. No entanto, ao analisar o fluxo gênico de fora do estande de estudo, em marcadores codominantes o valor foi superestimado, enquanto em dominantes foi subestimado, concluindo então que os marcadores codominantes são mais eficientes para estudos de reconhecimento de paternidade.

Tew & Pan (2010) utilizaram marcadores SSR para identificar paternidade em cana-de-açúcar em sete policruzamentos e obtiveram identificação positiva de paternidade de 79 a 99% nas progênies avaliadas. Ainda segundo Tew & Pan (2010), quanto maior for a quantidade de marcadores utilizados no estudo, maior a possibilidade de encontrar o genitor masculino.

Aliado ao uso dos marcadores microssatélites, as diversas técnicas de identificação de paternidade possibilitaram muitos estudos visando o reconhecimento de paternidade. A análise de exclusão é uma das mais antigas e baseia-se na herança mendeliana, utilizando as incompatibilidades entre os pais e filhos para rejeitar hipóteses de pais e filhos em particular (Tabela 2). Ou seja, genótipos diferentes das combinações possíveis entre a mãe e pai, descartam a possibilidade de paternidade.

**Tabela 2.** Genótipos dos genitores, possíveis genótipos da sua descendência e genótipos excluídos.

<b>Mãe</b>	<b>Pai</b>	<b>Genótipos possíveis</b>	<b>Genótipos excluídos</b>
AA	AB	AA e AB	AC, BC, BD...

Esta técnica é mais poderosa quando há poucos candidatos pais e marcadores genéticos altamente polimórficos disponíveis. Apesar de ser uma técnica simples e de fácil aplicação, na análise de exclusão a presença de erros de genotipagem, alelos nulos e mutações podem contribuir para exclusões falsas, não assegurando a certeza da paternidade. (JONES e ANDREN, 2003).

Quando a exclusão total de paternidade não é possível, podem ser empregadas as análises de probabilidade categórica, onde a prole é distribuída para um genitor masculino e a fracionária, onde a prole é dividida entre todos os machos compatíveis. Além destas duas técnicas a reconstrução dos genótipos também pode ser utilizada para chegar na identificação da paternidade. Esta técnica consiste em reconstruir os genótipos parentais de matrizes de descendentes de irmãos completos ou meios irmãos (JONES e ANDREN, 2003).

No umbuzeiro, a inexistência de um protocolo para cruzamentos manuais dificultam os avanços em atividades voltadas ao melhoramento da espécie. O cruzamento manual é uma técnica muito utilizada em programas de melhoramento genético de plantas para obtenção de híbridos com características superiores. No entanto, no umbuzeiro um fator que chama atenção para esta espécie é a sua estrutura floral muito pequena e de difícil manipulação, que provavelmente contribuirá para que a taxa de híbridos seja muito baixa.

Em mangueira, que também apresenta flores pequenas, a estratégia de cruzamentos naturais foi utilizada visando a obtenção de híbridos, associada à utilização de marcadores microssatélites para a identificação do parental masculino (Santos et al, 2010). Os policruzamentos, aliados ao uso de marcadores microssatélites para a identificação dos possíveis parentais masculinos, poderão se consolidar como uma ferramenta de apoio para o estabelecimento de programa de melhoramento do umbuzeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR-BARAJAS, E. et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in *Spondias radlkoferi* (Anacardiaceae). **Applications in plant sciences**, v. 2, n. 11, p. 1400079, 2014.

ALMEIDA, C. C. S.; CARVALHO, P. C. L.; GUERRA, M. Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid Umbu-cajá (Anacardiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 155, n. 4, p. 541-547, 2007.

AMABILE, R. F.; VILELA, M. S.; PEIXOTO, J. R. Melhoramento de plantas: variabilidade genética, ferramentas e mercado. **Embrapa Cerrados-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2018.

ANDERSEN, O.; ANDERSEN, V. U. **As frutas silvestres brasileiras**. Rio de Janeiro: Globo, p. 195-197, 1988.

AZEVEDO, H. S. F. S. et al. Avaliação da transferibilidade para *Euterpe precatoria* demarcadores microssatélites desenvolvidos para *Euterpe edulis*. In: **Embrapa Rondônia-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. Trabalho apresentado no Congresso Norte-Nordeste de Pesquisa e Inovação, 2018., 2018.

BALBINO, E. et al. Genome survey and development of 18 microsatellite markers to assess genetic diversity in *Spondias tuberosa* Arruda Câmara (Anacardiaceae) and cross-amplification in congeneric species. **Molecular biology reports**, p. 1-7, 2019.

BARBOSA, D. C. A.; BARBOSA, M. C. A.; LIMA, L. C. M. Fenologia de espécies lenhosas da Caatinga. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Ed.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife: Universitária UFPE, p. 657-693. 2003.

BATISTA, F. R. C. O umbuzeiro e o Semiárido brasileiro: UMBU E SEUS ASPECTOS DE PRODUÇÃO. In: BATISTA, F. R.C. O., et al. Campina Grande: INSA, 2015. p. 10.

BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F.; CARVALHO, F. Irajá Felix de. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciencia Rural**. Santa Maria. vol. 27, n. 3 (jul./ago. 1997), p. 513-520, 1997.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 2 ed. Viçosa: UFV, p. 55-66. 1998.

BORÉM, A.; CAVASSIM, J.E. Blocos de Cruzamento. In: BORÉM, A. **Hibridação Artificial em Plantas**. 2 ed. Viçosa: UFV, cap.2, p.15-61.

CAVALCANTI, N. B.; RESENDE, G. M. Ocorrência de xilopódios em plantas nativas de imbuzeiro. **Caatinga**, Mossoró, v.19, n.3, p.287-293. jul./set. 2006.

CONAB. **COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO**. Análise mensal: Janeiro, 2017. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-umbu/item/6315-umbu-analise-mensal-janeiro-2017> Acesso em: 04 jan. 2019.

CRUZ, C.D.; FERREIRA, F.M.; PESSONI, L.A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Viçosa: Editora Suprema, 620p. 2011.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. v.2, ed.2, Viçosa, MG: Editora UFV, 144p. 2006.

DANTAS JR, O. R. **Qualidade e capacidade antioxidante total de frutos de genótipos de umbuzeiro oriundos do semi-árido nordestino**. 2008. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Agronomia) -Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB.

DUQUE, J. G. **O Nordeste e as lavouras xerófilas**. Mossoró: ESAM, 1980.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007.

FAO- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. FAOSTAT. Divisão de estatística. Disponível em:< <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> >. Acesso em: 06 jan. 2020.

FRANKHAM, R.; BRISCOE, D. A.; BALLOU, J. D. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge university press, p. 617. 2002.

GERBER, S. et al. Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 8, p. 1037-1048, 2000.

GIACOMETTI, D. C. Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil. **Simpósio nacional de recursos genéticos de fruteiras nativas**, v. 1, p. 13-27, 1992.

GOIS, I.B. et al. Diversidade genética entre indivíduos de *Spondias lutea* L. procedentes do baixo São Francisco sergipano, por meio de marcadores RAPD. **Revista Árvore**, v. 38, n. 2, p. 261-270, 2014.

GOLDSTEIN, D. B.; SCHLOTTER, C. **Microsatellites: Evolution and Applications**. New York: Oxford University Press, 343 p. 1999.

GOMES, R.P. Mundo Agrícola. São Paulo, v.14, n.159, p.94-97, 1965.

GRATTAPAGLIA, D.; FERREIRA, M. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **EMBRAPA, Brasília**, v. 3, 1998.

HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. Quantitative genetics in maize breeding. Ames. Iowa State University Press. 2 ed, 468p, 1988.

HITTLE, C.N. A Study of the Polycross Progeny Testing Technique as Used in the Breeding of Smooth Bromegrass 1. **Agronomy Journal**, v. 46, n. 11, p. 521-523, 1954.

IBGE- **Instituto brasileiro de geografia e estatística**. Produção agrícola municipal e da Silvicultura. 2018. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613#resultado> > Acesso em: 6 jan. 2020

IBGE- **Instituto brasileiro de geografia e estatística**. Produção da extração vegetal e da Silvicultura. 2018. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/289#resultado> > Acesso em: 6 jan. 2020

JIMÉNEZ, P.; COLLADA, C. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. **Forest Systems**, v. 9, n. 4, p. 237-248, 2000.

JONES, A. G.; ARDREN, W. R. Methods of parentage analysis in natural populations. **Molecular ecology**, v. 12, n. 10, p. 2511-2523, 2003.

JUNQUEIRA, K. P. et al. Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero *Passiflora* por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 191-196, 2008.

KALIA, R. K. et al. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, n. 3, p. 309-334, 2010.

KANTETY, R.V. et al. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. **Plant. molecular biology**. v. 48, n. 5-6, p. 501-510, 2002.



MACHADO, I. C.; LOPES, A. V.; SAZIMA, M. Plant sexual systems and a review of the breeding system studies in the Caatinga, a Brazilian tropical dry forest. **Annals of Botany**, v. 97, n. 2, p. 277-287, 2005.

MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agropecuária Brasileira em Números. Fevereiro de 2019. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/agropecuaria-brasileira-em-numeros>>

MEDEIROS, S. S. et al. **Sinopse do censo demográfico para o Semiárido brasileiro**. Instituto Nacional de Seminário (INSA), 2012.

MITCHELL, John D.; DALY, Douglas C. A revision of *Spondias* L. (Anacardiaceae) in the Neotropics. **PhytoKeys**, n. 55, p. 1, 2015.

MOURA, M.S.B et al. Clima e água de chuva no Semi-Árido. **Potencialidades da água de chuva no semi-árido brasileiro. Petrolina: Embrapa Semi-Árido**, v. 1, p. 37-59, 2007.

NADIA, T. L.; MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. Pollination of *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae) and analysis of pollinators share with *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae), fruit species endemic to the " caatinga". **Brazilian Journal of Botany**, v. 30, n. 1, p. 89-100, 2007.

NANDAKUMAR, N. et al. Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers. **Euphytica**, v. 136, n. 3, p. 257-264, 2004.

NASCIMENTO, A. S. et al. Transferibilidade e mapeamento de microssatélites entre *Theobroma cacao* L. E *Theobroma grandiflorum* (WILLD. EX. SPRENG.) Schum. 2019.

NASCIMENTO, C.E.S.; OLIVEIRA, V.R.; NUNES, R.F.M.; ALBUQUERQUE, T.C. **Propagação vegetativa do umbuzeiro**. In: CONGRESSO FLORESTAL PANAMERICANO, 1.; CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 7., 1993. Curitiba, PR. Anais... São Paulo: SBS/SBEF, 1993. p. 454-456.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. Columbia university press, p. 512. 1987.

NEVES, O. S. C.; CARVALHO, J. G. Tecnologia da produção do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.). **Lavras: UFLA**, 2005.

NOGUEIRA, A. M.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. DA S. Transferability of Microsatellites from *Psidium guajava* to *Eugenia*, *Myrciaria*, *Campomanesia*, and *Syzygium* Species (Myrtaceae). **Plant Molecular Biology Reporter**. DOI 10.1007/s11105-015-0921-7. 2015.

OLIVEIRA, V. R. et al. *Spondias tuberosa*: Umbu. **Embrapa Semiárido-Capítulo em livro técnico (INFOTECA-E)**, 2018.

PELL, S. K. et al. Anacardiaceae. In: KUBITZKI, K. (Ed.) The Families and Genera of Vascular Plants v. 10. Berlin: Springer Verlag, 2011. p. 7–50. and Genera of Vascular Plants v. 10. Berlin: **Springer Verlag**, p. 7–50, 2011.

- PIRES, M. G. M. **Estudo taxonômico e área de ocorrência de *Spondias tuberosa* Arr. Cam. (umbuzeiro) no estado de Pernambuco - Brasil.** 1990. 290 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- POEHLMAN, J.M.; SLEPER, D.A. **Breeding field crops.** Iowa State Univ Press, Ames, Iowa, USA, 4th ed., p.444. 1995.
- RAMOS, R. F. et al. Genetic diversity assessment for *Eugenia uniflora* L., *E. pyriformis* Cambess., *E. brasiliensis* Lam. and *E. francavilleana* O. Berg neotropical tree species (Myrtaceae) with heterologous SSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 61: 267-272, 2014.
- RAMOS, S.R.R.; QUEIROZ, M.A.; ROMÃO, R.L.; SILVA JÚNIOR, J.F. Germoplasma vegetal conservado no nordeste brasileiro: situação atual, prioridades e perspectivas. **Magistra**, v. 20, n. 3, p. 205-217, 2008.
- RAY, M. K.; PHULWARIA, M.; SHEKHAWAT, N. S. **Transferability of simple sequence repeat (SSR) markers developed in guava (*Psidium guajava* L.) to four Myrtaceae species.** Molecular Biology Report, 40:5067–5071, 2013.
- SÁ, N.C., SILVA, E.M.S, BANDEIRA, A.S. A cultura da uva e do vinho no Vale do São Francisco. **Revista Desenvolvimento Econômico**. 461–91. (2015).
- SANTANA, I. B. B. et al. Variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 868-876, 2011.
- SANTOS, C. A. F. Dispersão da variabilidade fenotípica do umbuzeiro no semi-árido brasileiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 923-930, 1997.
- SANTOS, C. A. F.; GAMA, R. N. C. S. AFLP estimation of the outcrossing rate of *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae), an endemic species to the Brazilian semiarid region. **Revista de biologia tropical**, v. 61, n. 2, p. 577-582, 2013.
- SANTOS, C. A. F. et al. Estratégias para o desenvolvimento de novas cultivares de mangueira para o Semiárido brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 493-497, 2010.
- SANTOS, C. A. F. et al. Estimativas de polinização cruzada em população de *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae) usando marcador AFLP. **Revista Árvore**, v. 35, n. 3, p. 691-697, 2011.
- SANTOS, C. A. F.; RODRIGUES, M. A.; ZUCCHI, M. I. Variabilidade genética do umbuzeiro no Semi-Árido brasileiro, por meio de marcadores AFLP. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.8, p.1037-1043, ago. 2008.
- SILVA-LUZ, C.L.; PIRANI, J.R. 2015 Anacardiaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4402> Acesso em: 06 jan. 2020.
- SILVA, C.M.M.; PIRES, I.E.; SILVA, H.D. Caracterização dos frutos do umbuzeiro. Petrolina: Embrapa, (**Embrapa. Boletim de Pesquisa, 34**) 11p. 1987.
- SILVA, P. C. G. et al. Caracterização do Semiárido brasileiro: fatores naturais e humanos. **Embrapa Semiárido-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2010.

SOUSA, L. L. **Transferibilidade de marcadores microssatélites em espécies de *Psidium***. Ciência & Tecnologia: Fatec-JB, Jaboticabal, V.10, 2018.

TAUTZ, D. Hypervariability of Simple Sequences as a General Source for Polymorphic DNA Markers. **Nucleic Acids Research**, n. 17, p. 6463-6471, 1989.

TEW, T. L.; PAN, Y. B. Microsatellite (simple sequence repeat) marker-based paternity analysis of a seven-parent sugarcane polycross. **Crop Science**, v. 50, n. 4, p. 1401-1408, 2010.

TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações. **Editora SBG Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, SP**, v. 181, 94 p. 2017.

## CAPÍTULO I

### DESENVOLVIMENTO, TRANSFERIBILIDADE E AVALIAÇÃO DE MICROSSATÉLITES EM *Spondias tuberosa* Arruda

Viviane Nunes dos Santos<sup>1</sup>, Renata Natália Cândido de Souza Gama<sup>3</sup> Fabricio Francisco Santos da Silva<sup>3</sup>, Carlos Antônio Fernandes Santos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mestranda do programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, email: [viviane7414@gmail.com](mailto:viviane7414@gmail.com) <sup>2</sup> Pesquisador Embrapa Semiárido, email: [carlos-fernandes.santos@embrapa.br](mailto:carlos-fernandes.santos@embrapa.br); <sup>3</sup>Doutor(a) em Recursos Genéticos Vegetais, email: [renata.natalia@hotmail.com](mailto:renata.natalia@hotmail.com); [fabriciofrancisco2006@gmail.com](mailto:fabriciofrancisco2006@gmail.com)

### RESUMO

O umbuzeiro é umas das plantas de maior representatividade para o Semiárido brasileiro e apresenta um grande potencial para o mercado frutícola. Estudos com o uso de marcadores moleculares ainda são muito limitados para esta espécie. O objetivo do presente estudo foi desenvolver, avaliar e transferir locos de sequências simples repetidas (SSR) para *Spondias tuberosa* Arruda, para apoiar trabalhos de recursos genéticos e melhoramento da espécie. Os locos SSR para umbuzeiro foram desenvolvidos a partir de uma biblioteca genômica enriquecida e avaliados via reação em cadeia de polimerase. Quinze locos SSR de *S. radlkoferi* foram avaliados em *S. tuberosa*, bem como seis locos SSRs específicos para essa espécie. Todos os locos SSR foram avaliados em oito indivíduos de umbuzeiro. Dos 14 pares de primers desenvolvidos, seis amplificaram, e apenas dois apresentaram polimorfismo. Todos os locos SSR de *S. radlkoferi* foram transferidos para o umbuzeiro, entretanto, apenas quatro foram polimórficos na população genotipada. Entre os seis locos SSR específicos da espécie, todos foram polimórficos na população genotipada. No total foram identificados 12 locos SSR, sendo dois novos para *Spondias*, com conteúdo de polimorfismo de informação variando de 0,195 a 0,744 e heterozigosidade esperada e observada de 0,233 a 0,825 e 0,250 a 0,750, respectivamente, sendo indicados para estudos de genética populacional e melhoramento da espécie.

**Palavras-chave:** Umbuzeiro, SSR, melhoramento.

## ABSTRACT

Umbuzeiro is one of the most representative plants for the Brazilian semiarid region and has great potential for the fruit market. Studies with the use of molecular markers are still very limited for this species. The aim of the present study was to develop, evaluate and transfer loci of single sequence repeat (SSR) to *Spondias tuberosa* Arruda, to support work on genetic resources and improvement of this species. The SSR loci for umbuzeiro were developed from an enriched genomic library and evaluated via polymerase chain reaction. Fifteen SSR loci of *S. radlkoferi* were evaluated in *S. tuberosa*, as well as six SSR loci specific for this species. All SSR loci were evaluated in eight umbuzeiro individuals. Of the 14 pairs of primers developed, six amplified, and only two presented polymorphism in the genotyped population. All SSR loci of *S. radlkoferi* were transferred to umbuzeiro, however, only four were polymorphic in the genotyped population. All six species-specific SSR loci were polymorphics in the genotyped population. In total, 12 SSR loci were identified, two new for *Spondias*, with information polymorphism content ranging from 0.195 to 0.744 and expected and observed heterozygosity from 0.233 to 0.825 and 0.250 to 0.750, respectively, being indicated for population genetics and breeding studies of this species.

**Key- words:** Umbuzeiro, SSR, plant breeding.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) é uma das plantas que se destaca pela sua importância social, associada à sua resistência aos períodos de seca, devido a presença de raízes modificadas – xilopódios, que permitem o armazenamento de água. Pertence à família Anacardiaceae, que é caracterizada por apresentar muitas espécies valorizadas no mercado frutícola (PELL, 2004). O umbuzeiro também apresenta grande potencial econômico que pode ser explorado para o consumo *in natura*, produção de doces, geleias, sucos, dentre outros subprodutos.

Silva et al. (1987), estudando a caracterização de frutos do umbuzeiro, constataram a existência de uma grande variação fenotípica, indicando variabilidade genética dentro da espécie. Essa variabilidade foi corroborada pelo trabalho de Santos et al. (2008), que estudaram a variabilidade genética do umbuzeiro por meio de marcadores AFLP, reportando alta variabilidade entre populações, conseqüentemente, indicando o potencial para selecionar genótipos superiores para estudos no melhoramento genético, visando novas cultivares com características produtivas superiores.

A utilização de marcadores genéticos é de grande contribuição para a caracterização genética da espécie, sendo importante para trabalhos voltados à conservação e ao melhoramento da espécie. Os marcadores SSR são largamente aplicados em estudos genéticos, incluindo conservação genética, genética de populações, melhoramento molecular e testes de paternidade. Essa ampla aplicação deve-se ao fato de que SSRs são codominantes e multialélicos, são altamente reprodutíveis, têm ampla resolução e são baseados na reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) (OLIVEIRA et al., 2006).

Apesar desses avanços, os SSRs têm sido identificados para um número limitado de espécies de importância econômica, sendo a quantidade de iniciadores SSRs disponíveis para as espécies trabalhadas bastante variáveis, muitas vezes insuficientes para uma melhor caracterização genética. Em algumas situações a 'transferibilidade' de SSRs entre espécies próximas tem sido avaliada como uma forma de aplicar esses marcadores para espécies que não dispõem ou dispõem de número limitado dos mesmos (VARSHNEY et al., 2005).

A transferibilidade de marcadores SSRs desenvolvidos a partir de espécies do

mesmo gênero e até família tem sido reportado com sucesso, sendo uma alternativa para estudos de genética de populações. Sousa et al. (2018) avaliando transferibilidade, conseguiram percentagem de 83,4% utilizando primers desenvolvidos para *P. guajava* em 24 espécies do gênero *Psidium*. Nogueira et al. (2015) transferiram 152 de 158 marcadores SSRs de *P. guajava* para pelo menos uma de 16 espécies de *Eugenia*. Percentuais altos de transferibilidade também foram observados no gênero *Euterpe*, onde houve 100% de transferibilidade de *E. edulis* para *E. precatória* (AZEVEDO et al, 2018). Percentual alto de transferibilidade também foi observado em locos SSR de cupuaçuzeiro transferidos para o cacau, com taxa de 93,3% (NASCIMENTO et al, 2019).

Apesar da importância direta que o umbuzeiro representa para o Semiárido brasileiro, como uma frutífera de potencial econômico e de grande apelo social, estudos voltados aos recursos genéticos ainda são limitados. No umbuzeiro, marcadores enzimáticos foram utilizados para quantificar variabilidade genética em duas populações, encontrando alta variabilidade dentro das populações (SOUZA et al, 2002). Santos et al (2011) utilizaram marcadores do tipo AFLP para estimar taxas de polinização cruzada em umbuzeiro. Balbino et al (2019) desenvolveram 18 locos SSRs para umbuzeiro, transferindo para três espécies de *Spondias*. A aplicação de marcadores SSR no umbuzeiro poderá facilitar estudos de melhoramento da espécie, o melhor aproveitamento da variabilidade genética presente no banco de germoplasma, assim como manejá-lo de forma adequada.

O objetivo do presente estudo foi desenvolver, avaliar e transferir locos de sequências simples repetidas (SSR) para *S. tuberosa*, para apoiar trabalhos de recursos genéticos e melhoramento da espécie.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Material genético e extração de DNA**

Os tecidos vegetais obtidos para o desenvolvimento, transferibilidade e avaliação de marcadores microssatélites foram coletados em experimento de competição de clones, nos acessos BGU: 30, 37, 44, 48, 52, 55 e 68 e uma amostra

de umbuzeiro de vegetação espontânea na Embrapa Semiárido. Os acessos do BGU foram selecionados para maior tamanho de frutos. Amostras de folhas jovens e sadias foram coletadas para extração de DNA total, acondicionadas em caixas de isolamento térmico, a baixas temperaturas.

A extração do DNA foi realizada com base no protocolo de CTAB 2X (DOYLE & DOYLE, 1987), com algumas alterações: Os tecidos vegetais para obtenção do DNA total foram macerados em nitrogênio líquido e cada respectiva amostra transferida para tubos eppendorf de 2 mL, contendo 950 µL de CTAB 2%. Os tubos foram levados ao banho maria a 60°C por 30 min, sendo invertidos a cada 10 min. Finalizado este processo as amostras foram deixadas cinco minutos em temperatura ambiente e em seguida adicionados 950 µL da mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguida de centrifugação a 10000 rpm por 10 min. 700 µL do sobrenadante foram aliquotados para tubos eppendorf de 1,5 mL e 466 µL de álcool isopropílico gelado foram adicionados, sendo os tubos suavemente invertidos e mantidos em gelo por 20 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 min, até a formação de um pellet no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado, sendo adicionados 400 µL de etanol a 70%, seguido de centrifugação a 12000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e 400 µL de etanol a 98% foi adicionado, seguido de centrifugação rápida, sendo o sobrenadante derramado suavemente, deixando-se o pellet de DNA à temperatura ambiente até estar completamente seco. O pellet de DNA foi ressuspenso em TE (10 Mm Tris- HCl e 1 Mm EDTA, Ph 8). A quantificação do DNA foi obtida através da análise visual comparativa das amostras em gel de agarose 0,8% (p/v), corado com brometo de etídio e padronizadas em 10 ng µL<sup>-1</sup>.

### **3.2.2 Desenvolvimento de microssatélites**

Para a construção da biblioteca genômica, foi coletado o material vegetal de umbuzeiro. O DNA genômico foi digerido por hidrólise enzimática, para geração de fragmentos com tamanhos adequados. Foi observado no gel um arraste uniforme entre 700 e 1200pb. Os fragmentos ligados aos adaptadores foram pré-amplificados usando o primer Rsa21. A reação da ligação foi visualizada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sendo observado no gel um arraste uniforme entre 300 e 1200pb.



A reação foi purificada usando o kit “Quiaquick PCR purification kit”. Após a ligação do DNA aos adaptadores foi feita uma seleção dos fragmentos contendo seqüências de microssatélites. O DNA plasmidial de cada clone foi extraído, amplificado, purificado e sequenciado.

As seqüências foram submetidas ao programa SSRIT - Simple Sequence Repeat Identification Tool para a identificação dos microssatélites. Identificados os microssatélites, as seqüências foram submetidas ao programa *Primer 3 plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>), para desenho dos primers, sendo excluídos nessa etapa, as seqüências dos adaptadores Rsa21 e Rsa25 e o sítio de reconhecimento da enzima de restrição (CTAC).

Os ‘primers’ foram enviados para serem sintetizados e em seguida submetidos à validação ou amplificação de produtos em PCR. Para isso, foi realizada uma reação de PCR utilizando o DNA dos oito acessos para verificar polimorfismo.

### **3.2.3 Avaliação e transferibilidade de marcadores microssatélites SSR**

Seqüências de seis pares de primers *S. tuberosa* desenvolvidos por Balbino et al. (2019) e 15 pares de primers de *S. radlkoferi* desenvolvidos por Aguilar- Bajas (2014) foram testados nos oito acessos de *S. tuberosa*, descritos anteriormente.

### **3.2.4 Reações de PCR (Polymerase Chain Reaction) para verificação de amplificação e polimorfismo**

As reações de PCR para todos os primers analisados foram ajustadas para um volume final de 10µl. As reações foram de: 1µl de tampão 10x, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,22 µM de cada dNTP; 0,4µM de cada primer (“forward” e “reverse”), uma unidade de *Taq* DNA polimerase e 10 ng de DNA genômico.

As amplificações foram realizadas em termociclador Biometra. O programa foi iniciado com 15 min a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min 30 s a 58 a 60°C e 1 min a 72 °C e finalizando com uma etapa de 10 min a 72°C para a extensão da fita.

Os produtos da amplificação foram observados através da utilização do gel de poliacrilamida a 6% de concentração, conforme metodologia descrita por Costa e Santos (2013), corado com nitrato de prata (CRESTE et al. 2001).

### 3.2.5 Análise dos marcadores

O número de pares de bases (bp) para cada alelo foi estimado usando o método de mobilidade inversa, baseado na regressão de produtos de tamanho conhecido de marcador molecular de 50 pb (Ludwig Biotec®).

A frequência alélica, número de genótipos e alelos, conteúdo de informação de heterozigosidade e polimorfismo (PIC) foram calculados para cada microsatélites, para os oito indivíduos de *S. tuberosa* utilizando o programa cervus 3.0.7 (MARSHALL et al., 1998).

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.3.1 Desenvolvimento de marcadores SSR para *S. tuberosa*

Foram encontradas 14 sequencias SSR, das quais apenas seis amplificaram produtos de PCR corados em gel de poliacrilamida (Tabela 1). Segundo o arranjo dos nucleotídeos dentro dos motivos de repetição, os locos foram classificados como perfeitos e destes, cinco di-nucleotídeos (SSRU\_1; SSRU\_4; SSRU5; SSRU\_12 e SSRU\_13) e um tri-nucleotídeo (SSRU\_7).

**Tabela 1.** Sequencias de primers forward (F) e reverse (R) desenhados para *S. tuberosa*, com suas respectivas temperaturas de anelamento ( $T_m$ ), motivo de repetição (MT) e número de alelos (NA).

Primers	Sequência de primers (5' - 3')	$T_m$ (°C)	MT	NA
<b>SSRU1</b>	F:ATATTCGGGGCGGCAAAG	60	(CG)3	1
	R:TTTTGTGACGACGCATGG			
<b>SSRU4</b>	F:GTGGACTAACCCTTCGCTCA	60	(CT)3	1
	R:TTTCTCGATCAACCCCTTTG			
<b>SSRU5</b>	F:AGGTGGATGGGCTCTCCTAT	60	(TC)3	1
	R:CCGTTATTTGGCCCTTAGGT			

<b>SSRU7</b>	F: GTTGTTCAGGGAGGAAAAA			
	R: TTTCCCGGCTACCAAGTATGT	60	(AAG)5	2
<b>SSRU12</b>	F:CTGCCTTGGTGTGACTGTGT			
	R:GCAGAGTGAAAGCCCATGAT	60	(GT)7	2
<b>SSRU13</b>	F:ACTTAATCGCCTTGCAGCAC			
	R:TAAAGGACCCCGATTGACTG	60	(GC)Ex	1

Dos seis pares de primers desenvolvidos, quatro foram monomórficos (SSRU\_01, SSRU\_04, SSRU\_05 e SSRU\_13) e apenas dois apresentaram polimorfismo (SSRU\_07 e SSRU\_12) (Figura 1). A diversidade alélica para os primers desenvolvidos foi muito baixa, variando de um a dois alelos por loco (Tabela 1).



**Figura 1.** Amplificação de oito locos de SSR, desenvolvidos através de bibliotecas enriquecidas com sequências repetidas e avaliados em cinco acessos do BAG de Umbuzeiro.

O conteúdo de informação polimórfica obtido para os locos SSRU\_7 e SSRU\_12 foram considerados medianamente informativo, entre 0,25 e 0,50, e pouco informativo, abaixo de 0,25 respectivamente, segundo a classificação de Bolstein et al. (1980).

**Tabela 2.** Tamanho de bandas (TB), número de alelos (NA), heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) de dois locos microssatélites polimórficos desenvolvidos para *Spondias tuberosa*, avaliado em oito indivíduos do BGU da Embrapa Semiárido.

Locos	Sequência de primers 5' -3'	TB	NA	PIC	He	Ho
SSRU7	F: GTTGTTCAGGGAGGAAAAA R: TTTCCCGGCTACCAAGTATGT	536-550	2	0,31	0,375	0
SSRU12	F:CTGCCTTGGTGTGACTGTGT R:GCAGAGTGAAAGCCCATGAT	653-775	2	0,19	0,2187	0.25

Os valores de heterozigosidade esperada e observada para ambos os locos foram baixos, indicando que os primers analisados não são muito informativos nos indivíduos de umbuzeiro analisados. Balbino et al. (2019) desenvolveram marcadores

microssatélites para umbuzeiro com valores baixos de He e Ho em 72% dos locos avaliados.

### 3.3.2 Transferibilidade de microssatélites SSR

Dos 15 locos de *S. radlkoferi* avaliados, quanto ao potencial de amplificação utilizando oito indivíduos de *S. tuberosa*, todos apresentaram um bom padrão de amplificação em gel de poliacrilamida a 6% e um percentual de 100% de sucesso em transferibilidade efetiva. Esta alta percentagem pode ser atribuída ao fato de as duas espécies estudadas pertencerem ao mesmo gênero, ou seja, muito próximas (MISTURA, et al 2012). Percentuais altos de transferibilidade para espécies do mesmo gênero também foram encontrados em outros estudos. Azevedo et al. (2018) ao avaliarem a transferibilidade de locos microssatélites da espécie *Euterpe edulis* para *E. precatória*, também encontraram 100% de transferibilidade dos primers analisados. Nazareno et al. (2011), avaliando 14 pares de primers desenvolvidos para *Butia eriospatha* e testados em *B. catarinensis*, obtiveram 86%. Aguilar-Bajaras (2014) encontrou 77,8% ao transferir primers desenvolvidos para *Spondias radlkoferi* em *S. mombin*. Apesar do sucesso de transferibilidade no presente estudo, apenas quatro dos 15 pares de primers avaliados apresentaram polimorfismo (Tabela 3).

O número de alelos obtido por locos avaliados nos oito indivíduos de *S. tuberosa* variou entre três e seis. Os locos SPO4 e SPO14 apresentaram a maior diversidade alélica, com seis e cinco alelos, respectivamente. A menor diversidade alélica foi observada nos locos SPO8 e SPO18, que apresentaram apenas três alelos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Temperaturas de anelamento ( $T_m$ ), número de alelos (NA) e tamanho de bandas (TB), heterozigidade esperada (He) e heterozigidade observada (Ho) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) de locos microssatélites polimórficos avaliados e transferidos de *S. radlkoferi* para *S. tuberosa*

Locos	Sequência do primer 5' – 3'	Características em <i>S. tuberosa</i>					
		$T_m$ (°C)	NA	TB	PIC	HE	HO
SSRO4	F: CGCTAGTTGTCATTCGCGG R: GCTTAACCTCTGGAAAGTCGC	62	6	548-696	0,744	0,825	0,625

<b>SSRO8</b>	F:GCAGCAGCCATTTGTGAAC R:CACGTGTTCCCAGTTATGATTTG	60	3	505-529	0,427	0,508	0,625
<b>SSRO14</b>	F:ACACCAACGTTTTCGGAG R:TCTAGGTAGACAGCGACAAATC	62	5	640-707	0,636	0,742	0,875
<b>SSRO18</b>	F:TCTATTTGCGTCCAGGTATTTTC R:GAATGGGCACGTTTCCTTGG	62	3	820-874	0,511	0,633	0,750

Os valores de conteúdo de informação polimórfica (PIC), encontrados variaram de 0,427 a 0,744, com média de 0,579 (Tabela 2). De acordo Bolstein et al. (1980) os primers podem ser considerados muito informativos, medianamente informativos e pouco informativos, com valores superiores a 0,5, entre 0,25 e 0,50 e, inferiores a 0,25, respectivamente.

Os locos SP04, SP014 e SPO18 apresentaram PIC considerados alto, com exceção do SPO8 que foi considerado médio. Valores de PIC semelhantes foram observados por Araya et al. (2016) ao testarem a transferibilidade de primers de Maracujá-Azedo (*Passiflora edulis* Sims) para 78 espécies do gênero *Passiflora*, com valores variando de 0,46 a 0,77.

A heterozigidade esperada variou entre 0,508 e 0,825, e os valores de heterozigidade observada variaram entre 0,625 e 0,875 (Tabela 3). Com exceção do primer SPO4, os demais locos SPO8, SPO14 e SPO18 apresentaram valores de  $H_o$  maiores que  $H_e$ .

### 3.3.3 Avaliação de microssatélites de *S. tuberosa*

Dos seis locos SSR desenvolvidos especificadamente para umbuzeiro (Balbino et al. (2019), todos apresentaram amplificação em gel de poliacrilamida e polimorfismo na população de indivíduos de genotipada (Tabela 4). A diversidade alélica dos locos de *S. tuberosa* variou entre dois e quatro alelos (Tabela 4), sendo o loco TUB103 o de maior diversidade alélica. Os conteúdos de informação polimórfica dos locos de *S. tuberosa* avaliados foram classificados como pouco informativos a medianamente informativos, sendo o loco TUB93 o que apresentou menor informação polimórfica com 0,195 (Tabela 4). A heterozigidade esperada variou entre 0,233 e 0,575, enquanto os valores de heterozigidade observada variaram entre 0,250 e 0,750.

**Tabela 4.** Temperaturas de anelamento ( $T_m$ ), número de alelos (NA) e tamanho de bandas (TB), heterozigiosidade esperada (He) e heterozigiosidade observada (Ho) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) de locos microssatélites de *S. tuberosa*.

Locos	Sequência dos primers 5' – 3'	Características em <i>S. tuberosa</i>					
		$T_m$ (°C)	NA	TB	PIC	HE	HO
<b>TUB78</b>	F: TGCTCTGCCTTCCAACATGT R: GTACGTGAGGGACAATGGGG	59	3	558-642	0,427	0,508	0,625
<b>TUB84</b>	F: CACCTCCTACGTTACTGCCA R: TCAAAGTGGATTCAGGCATGC	59	2	580-613	0,337	0,458	0,625
<b>TUB93</b>	F: AGCCTTTTTGAGTCACATGCA R: AACTGATGGTACGTGAACAA	60	2	570-624	0,195	0,233	0,250
<b>TUB94</b>	F: TGTCTGAGGATCGAGACGAGA R: GCACGCGCTTACTTATGTTGG	60	3	689-767	0,482	0,575	0,750
<b>TUB98</b>	F: AGCGAAAAGAATGATGAAGGC R: GTTGGCTTCTTTCTTGCGGC	60	3	647-683	0,427	0,508	0,625
<b>TUB103</b>	F: GGAGCAGTGAAACCCTGAA R: GTCCAGGTCGCCGTAAAGAA	60	4	519-533	0,387	0,442	0,500

### 3.4 CONCLUSÃO

Dos 14 locos desenvolvidos como SSR apenas seis amplificaram, sendo que apenas dois apresentaram polimorfismo na população de indivíduos genotipadas.

Os 15 locos SSR de *S. radlkoferi* avaliados apresentaram um bom padrão de amplificação em gel de poliacrilamida, com sucesso de 100% de sucesso de transferibilidade, sendo que apenas quatro locos apresentaram polimorfismo na amostra de indivíduos genotipada.

Dos seis locos SSR desenvolvidos especificadamente para umbuzeiro todos apresentaram amplificação em gel de poliacrilamida e polimorfismo na população de indivíduos de genotipada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR-BARAJAS, E. et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in *Spondias radlkoferi* (Anacardiaceae). **Applications in plant sciences**, v. 2, n. 11, p. 1400079, 2014.
- ARAYA, S. et al. Desenvolvimento de marcadores microssatélites por meio do sequenciamento parcial do genoma de maracujá-azedo (*Passiflora Edulis* Sims) e transferibilidade para 78 espécies do gênero passiflora. In: **Embrapa Cerrados-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: SIMPÓSIO MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2016, Brasília, DF. Variabilidade genética, ferramentas e mercado: anais. Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2016., 2016.
- AZEVEDO, H. S. F. S. et al. Avaliação da transferibilidade para *Euterpe precatória* de marcadores microssatélites desenvolvidos para *Euterpe edulis*. In: **Embrapa Rondônia-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. Trabalho apresentado no Congresso Norte-Nordeste de Pesquisa e Inovação, 2018., 2018.
- BALBINO, E. et al. Genome survey and development of 18 microsatellite markers to assess genetic diversity in *Spondias tuberosa* Arruda Câmara (Anacardiaceae) and cross-amplification in congeneric species. **Molecular biology reports**, p. 1-7, 2019.
- BOLSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- COSTA, S. R.; SANTOS, C. A. F. Allelic database and divergence among *Psidium* accessions by using microsatellite markers. **Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2013.
- CRESTE, S.; NETO, A. T.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 4, p. 299-306, 2001.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, n.12, p.013-15, 1987.
- MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUIK, L et al. Statistical confidence for likelihoodbased paternity inference in natural populations. **Molec. Ecol.**,7 (5): 639-655, 1998.
- MISTURA, C. C. et al. Transferibilidade de marcadores microssatélites de coco (*Cocos nucifera*) para butiá (*Butia odorata*). **Embrapa Clima Temperado-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2012.
- NASCIMENTO, A. S. et al. Transferibilidade e mapeamento de microssatélites entre *Theobroma cacao* L. e *Theobroma grandiflorum* (WILLD. EX. SPRENG.) Schum. 2019.
- NAZARENO, A. G.; ZUCCHI, M. I.; REIS, M. S. Microsatellite markers for *Butia eriospatha* (Arecaceae), a vulnerable palm species from the Atlantic Rainforest of Brasil. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v.98, n.7, p.198-200, 2011.

NOGUEIRA, A. M.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. DA S. Transferability of Microsatellites from *Psidium guajava* to *Eugenia*, *Myrciaria*, *Campomanesia*, and *Syzygium* Species (Myrtaceae). **Plant Molecular Biology Reporter**. DOI 10.1007/s11105-015-0921-7. 2015.

OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, 29: 294-307, 2006.

PELL, S. K. Molecular systematics of the cashew family (Anacardiaceae). **Baton Rouge**: LSU, 2004. 192p. Ph.D Thesis.

SANTOS, C. A. F.; RODRIGUES, M. A.; ZUCCHI, M. I. Variabilidade genética do umbuzeiro no Semi-Árido brasileiro, por meio de marcadores AFLP. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.43, n.8, p.1037-1043, ago. 2008

SANTOS, C. A. F. et al. Estimativas de polinização cruzada em população de *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae) usando marcador AFLP. **Revista Árvore**, v. 35, n. 3, p. 691-697, 2011.

SILVA, C. M. M. de; PIRES, I. E.; SILVA, H. D. Caracterização dos frutos do umbuzeiro. Petrolina: Embrapa, (**Embrapa. Boletim de Pesquisa, 34**) 11p. 1987.

SOUZA, J. C. et al. Variabilidade genética em populações naturais de umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) com base em dados isoenzimáticos. In: **Embrapa Semiárido-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 48., 2002, Águas de Lindoia. A genética na inclusão social. Águas de Lindoia: SBG, 2002., 2002.

SOUSA, L. L. **Transferibilidade de marcadores microssatélites em espécies de *Psidium***. Ciência & Tecnologia: Fatec-JB, Jaboticabal, V.10, 2018.

VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, 23: 48-55, 2005.



## CAPÍTULO II

### ANÁLISE DE PATERNIDADE EM POLICRUZAMENTOS DE *Spondias tuberosa* Arruda COM BASE EM LOCOS MICROSSATELITES

Viviane Nunes dos Santos<sup>1</sup>, Carlos Antônio Fernandes Santos<sup>2</sup>, Antônio Elton da Silva Costa<sup>3</sup>, Deisy Aiane Lima Aquino<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Mestranda do programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, email: [viviane7414@gmail.com](mailto:viviane7414@gmail.com) <sup>2</sup> Pesquisador, Embrapa Semiárido, email: [carlos-fernandes.santos@embrapa.br](mailto:carlos-fernandes.santos@embrapa.br); <sup>3</sup>Doutorando do programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas, UFRPE, email: [antonioelton.agro@gmail.com](mailto:antonioelton.agro@gmail.com) <sup>4</sup>Doutoranda do programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, email: [deisylima\\_17@hotmail.com](mailto:deisylima_17@hotmail.com)

### RESUMO

Os estudos genéticos visando ao melhoramento do umbuzeiro ainda são incipientes, mesmo esta espécie sendo de grande relevância para a região semiárida, que tem se destacado na fruticultura. O presente estudo objetivou identificar os genitores masculinos em policruzamentos de clones de umbuzeiro, com base em locos microssatélites, visando ao estabelecimento de programa de melhoramento da espécie. Para a determinação de paternidade, foi realizada a análise comparativa dos alelos dos parentais e das progênes resultantes dos policruzamentos e para exclusão/inclusão de paternidade foi considerada a presença de alelos exclusivos do parental presente em uma progênie. Os parentais apresentaram similaridade entre 0,31 e 0,65, indicando considerável divergência. Foi observada a formação de dois grupos: grupo I: umbu comum e BGUs 30, 37, 44, 55 e 68, e no grupo II: BGUs 48 e 52. Os marcadores microssatélites permitiram identificar 85% das progênes do BGU30 e 32% dos progenitores masculinos das progênes do BGU37, indicando que o policruzamento é uma alternativa para a obtenção de híbridos em umbuzeiro. Foram obtidas progênes resultantes do cruzamento dos BGUs 68, 44 e 48 com o BGU 30, inéditos e de grande interesse para o melhoramento da espécie.

**Palavras-chave:** Umbu, híbridos, microssatélites.

## ABSTRACT

Genetic studies aiming at improving umbuzeiro are still incipient, even though this species is of great relevance for the semiarid region, which has stood out in fruit growing. The present study aimed to identify the male parents in crosscrossing of umbuzeiro clones, based on microsatellite loci, aiming at establishing a species improvement program. For the determination of paternity, a comparative analysis of the alleles of the parents and the progenies resulting from the cross-breeding was performed and for exclusion / inclusion of paternity, the presence of alleles exclusive to the parent present in a progeny was considered. The parents showed similarity between 0.31 and 0.65, indicating considerable divergence. The formation of two groups was observed: group I: common umbu and BGUs 30, 37, 44, 55 and 68, and in group II: BGUs 48 and 52. The microsatellite markers allowed to identify 85% of the progenies of BGU30 and 32% of the male progenitors of the BGU37 progenies, indicating that crossbreeding is an alternative for obtaining hybrids in umbuzeiro. Progenies were obtained resulting from the crossing of BGUs 68, 44 and 48 with BGU 30, unprecedented and of great interest for the improvement of the species.

**Keywords:** Umbu, hybrids, microsatellites.

## 4.1 INTRODUÇÃO

O umbuzeiro é uma planta arbórea, que apresenta uma copa de numerosos galhos entrelaçados, com uma altura que varia de 4 a 6 m. Seus frutos são do tipo drupa, com peso variando de 4,5 a 96 g, formato elíptico ou arredondado, ricos compostos bioativos, como vitamina C, flavonoides, carotenoides, e compostos fenólicos (ANDERSEN e ANDERSEN, 1988; DANTAS JUNIOR, 2008; SILVA e ALVES, 2008; SANTOS et al. 1999). O umbuzeiro é uma espécie diploide ( $2n = 32$ ), predominante alógama, com taxa de polinização cruzada estimada em 80% (OLIVEIRA et al., 2018; ALMEIDA et al. 2007; MACHADO et al., 2006; SANTOS e GAMA, 2013).

As plantas do umbuzeiro ocorrem em todos os Estados do Semiárido brasileiro e é nesta região onde encontra-se maior parte da sua variabilidade genética (PRADO e GIBBS, 1993), parte fundamental para estudos de genética de populações, responsável pela formação de uma base genética necessária para os programas de melhoramento genético. A partir da variabilidade genética é possível selecionar caracteres de interesse, como maior tamanho de frutos, maiores teores de compostos bioativos e resistência a doenças.

Na literatura não existe protocolo estabelecido para cruzamento em umbuzeiro, o que dificulta os trabalhos de recombinação de genótipos. Entretanto, existem diferentes formas de recombinar genótipos e aumentar a variabilidade através de cruzamentos. Em espécies alógamas o policruzamento pode ser empregado, visto que esta técnica objetiva rearranjar as cultivares envolvidas no cruzamento (HITLLE, 1954). A técnica da polinização aberta em policruzamentos tem sido adotado em mandioca (FUKUDA e IGLESIAS, 2006) e em cana-de-açúcar (XAVIER et al., 2014).

A dificuldade de identificação da planta paternal nos policruzamentos (POEHLMAN e SLEPER, 1995) foi superada com a aplicação de marcadores moleculares, como demonstrado por Tew & Pan (2010) e Xavier et al., (2014), em cana-de-açúcar, com o uso de marcadores microssatélites, possibilitando a construção da genealogia de genótipos superiores. Marcadores microssatélites são sequências de um a seis nucleotídeos que se repetem e destacam-se devido ao seu grande conteúdo informativo, além de serem multialélicos, reprodutíveis e codominantes,

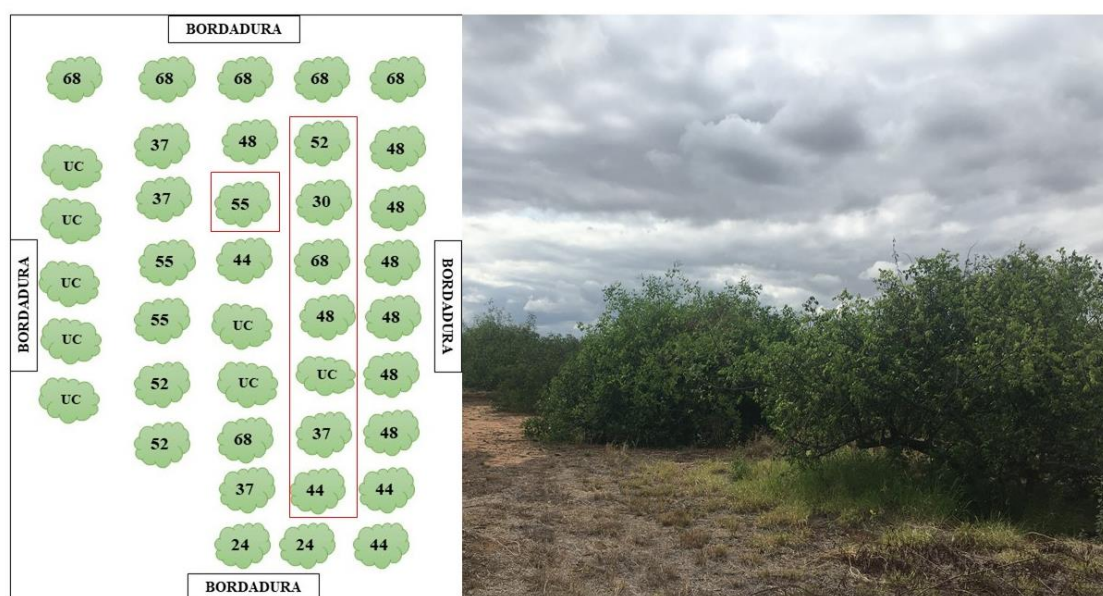
permitindo a diferenciação entre indivíduos homocigotos e heterocigotos (GRATTAPAGLIA e FERREIRA, 1998; TURCHETTO- ZOLET et al., 2017).

O objetivo deste trabalho foi identificar os prováveis genitores masculinos dos indivíduos de duas populações obtidas a partir da polinização aberta de oito parentais de umbuzeiro, visando estabelecimento de programa de melhoramento da espécie.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Material genético e extração de DNA

O material vegetal foi obtido de plantas resultantes de sementes da polinização aberta dos acessos maternos BGU30 e BGU37 com plantas parentais de ensaio de competição de clones mantido em área da Embrapa Semiárida (Figura 1), localizado no município de Petrolina-PE (Latitude de 09° 09'S e longitude 40° 22'W). Amostras de folhas jovens e sadias de 20 e 44 progênies das plantas maternas BGU30 e BGU 37, respectivamente, e sete potenciais acessos polinizadores (umbu comum – UC, BGU30 ou BGU37, BGU44, BGU48, BGU52, BGU55 e BGU68), foram coletadas e posteriormente armazenadas a temperatura de -80°C.



**Figura 1.** Croqui e imagem da área de coleta de amostra dos parentais: umbu comum, BGU30, BGU37, BGU44, BGU48, BGU52, BGU55 e BGU68. Sementes foram coletadas para avaliação das progênies nos acessos BGU 30 e BGU37.

A extração do DNA foi realizada com base no protocolo de CTAB 2X (DOYLE & DOYLE, 1987), com algumas alterações: Os tecidos vegetais para obtenção do DNA total foram macerados em nitrogênio líquido e cada respectiva amostra transferida para tubos eppendorf de 2 mL, contendo 950  $\mu$ L de CTAB 2%. Os tubos foram levados ao banho maria a 60°C por 30 min, sendo invertidos a cada 10 min. Finalizado este processo as amostras foram deixadas cinco minutos em temperatura ambiente e em seguida adicionados 950  $\mu$ L da mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguida de centrifugação a 10000 rpm por 10 min. 700  $\mu$ L do sobrenadante foram aliqotados para tubos eppendorf de 1,5 mL e 466  $\mu$ L de álcool isopropílico gelado foram adicionados, sendo os tubos suavemente invertidos e mantidos em gelo por 20 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 min, até a formação de um pellet no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado, sendo adicionados 400  $\mu$ L de etanol a 70%, seguido de centrifugação a 12000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e 400  $\mu$ L de etanol a 98% foi adicionado, seguido de centrifugação rápida, sendo o sobrenadante derramado suavemente, deixando-se o pellet de DNA à temperatura ambiente até estar completamente seco. O pellet de DNA foi ressuspensão em TE (10 Mm Tris- HCl e 1 Mm EDTA, Ph 8). A quantificação do DNA foi obtida através da análise visual comparativa das amostras em gel de agarose 0,8% (p/v), corado com brometo de etídio e padronizadas em 10 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>.

#### 4.2.2 Reações de amplificação e polimorfismo

As reações de amplificação foram feitas utilizando-se 10 oligonucleotídeos iniciadores (primers), sendo quatro desenvolvidos por Aguilar-Bajaras et al. (2014) e seis por Balbino et al. (2019) (Tabela 1). As reações de PCR (Polymerase Chain Reaction) foram ajustadas para um volume final de 10  $\mu$ L, contendo: 1  $\mu$ L de tampão 10x, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,22  $\mu$ M de cada dNTP; 0,4  $\mu$ M de cada primer (“forward” e “reverse”), uma unidade de *Taq* DNA polimerase e 10 ng de DNA genômico.

As amplificações foram realizadas em termociclador, com o programa proposto por Aguilar-Bajaras et al. (2014). Iniciado com 15 min a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min 30 s a 59 ou 60°C e 1 min a 72 °C e finalizando com uma etapa de 10 min a 72 °C. Os produtos da amplificação foram observados através da

utilização do gel de poliacrilamida a 6% de concentração, conforme metodologia descrita por Costa e Santos (2013), corado com nitrato de prata (CRESTE et al. 2001).

#### **4.2.3 Diversidade genética**

A análise de diversidade genética foi obtida a partir do programa NTSYSpc (ROHLF, 2009), com a construção da matriz de similaridade do índice de Jaccard. A distância de cada indivíduo foi gerada usando o método de agrupamento UPGMA (não ponderado, com base na média aritmética). O dendrograma foi testado usando a correlação cofenética.

A frequência alélica, heterozigosidade esperada e observada, conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) dos locos SSRs foram obtidos no programa Cervus 3.0 (KALINOWSKI et al. 2007).

#### **4.2.4 Análise de paternidade**

A análise de paternidade foi realizada com base na amplificação dos produtos de PCR dos marcadores SSR. A partir da distribuição alélica de cada indivíduo, foi realizada a comparação com os parentais de interesse e feita a análise por exclusão de paternidade, com base nas possíveis combinações de genótipo, considerando a presença de alelos exclusivos nos parentais presente em uma progênie, como podem ser observados nos “ANEXOS”.

### **4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **4.3.1 Reações de amplificação e polimorfismo**

Todos os marcadores utilizados apresentaram bons padrões de amplificação com conteúdo de informação polimórfica variando de 0,195 a 0,825. De acordo com

Bolstein et al. (1980), o conteúdo de informação polimórfica pode ser considerado altamente informativo, acima de 0,5, medianamente informativo, entre 0,25 e 0,50 e pouco informativo, abaixo de 0,25.

Dos marcadores avaliados, quatro foram muito informativos (SPO4, SPO8, SPO14, SPO18). Com exceção do TUB93, que foi o menos informativo, os demais marcadores foram medianamente informativos, com valores de PIC acima de 0,25 (Tabela 1). O PIC é um parâmetro muito importante quando se utiliza um marcador, pois testa a eficiência do marcador para análises de divergência. Silva et al., (2017) também encontraram valores de PIC acima de 0,25 na maioria dos marcadores ISSR utilizados para estimar a diversidade genética em *S. mombin*.

**Tabela 1.** Temperaturas de anelamento ( $T_m$ ), número de alelos (NA) e tamanho de bandas (TB), Heterozigosidade esperada (He) e Heterozigosidade observada (Ho) e Conteúdo de informação polimórfica (PIC) de locos microssatélites de *Spondias tuberosa*.

Nome do primer	Sequência dos primers 5' – 3'	Características em <i>S. tuberosa</i>					
		$T_m$ (°C)	NA	TB	PIC	HE	HO
<b>SSRO4</b>	F: CGCTAGTTGTCATTCGCGG R: GCTTAACCTCTGGAAAGTCGC	62	6	548 – 696	0,744	0,825	0,625
<b>SSRO8</b>	F: GCAGCAGCCATTTGTGAAC R: CACGTGTTCCCAGTTATGATTTG	60	3	505 – 529	0,427	0,508	0,625
<b>SSRO14</b>	F: ACACCAACGTTTGCGGAG R: TCTAGGTAGACAGCGACAAATC	62	5	640 – 707	0,636	0,742	0,875
<b>SSRO18</b>	F: TCTATTTGCGTCCAGGTATTTTC R: GAATGGGCACGTTCCCTTGG	62	3	820-874	0,511	0,633	0,750
<b>TUB78</b>	F: TGC TCT GCC TTC CAA CAT GT R: GTA CGT GAG GGA CAA TGG GG	59	3	558-642	0,427	0,508	0,625
<b>TUB84</b>	F: CAC CTC CTA CGT TAC TGC CA R: TCA AAC TGG ATT CAG GCA TGC	59	2	580-613	0,337	0,458	0,625
<b>TUB93</b>	F: AGC CTT TTT GAG TCA CAT GCA R: ACA CTG ATG GTA CGT GAA CAA	60	2	570-624	0,195	0,233	0,250
<b>TUB94</b>	F: TGT CTG AGG ATC GAG ACG AGA	60	3	689-767	0,482	0,575	0,750

	R: GCA CGC GCT TAC TTA TGT TGG								
<b>TUB98</b>	F: AGC GGA AAA GAA TGA TGA AGGC	60	3	647-683	0,427	0.508	0.625		
	R: GTT GGC TTC TTT CTT GCG GC								
<b>TUB103</b>	F: GGA GCA GTG AAA CCC CTG AA R: GTC CAG GTC GCC GTA AAG AA	60	4	519-533	0,387	0.442	0.500		

---

A heterozigosidade esperada variou de 0,233 a 0,825 e a observada de 0,250 a 0,825. Balbino et al. (2019) também encontraram valores de heterozigosidade esperada e observada próximos aos obtidos neste presente estudo, de 0,095 a 0,75 e 0,1 a 0,75, respectivamente, ao estimarem a diversidade genética em *S. tuberosa*. Em todos os casos a heterozigosidade observada foi maior que a esperada. Comportamento semelhante também foi observado por Gois et al. (2009), ao estimarem a variabilidade genética de *S. lutea* L. Moura et al. (2009), ao estudarem a diversidade genética em *Solanum lycocarpum*, também reportaram heterozigosidade observada maior que a esperada, indicando um excesso de heterozigotos em relação ao modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A heterozigosidade é um importante parâmetro dentro dos estudos genéticos, pois quando encontrados, em elevados níveis, indica grande de variabilidade genética entre os indivíduos, aumentando a possibilidade de novas combinações genotípicas (SEBBENN et al., 2000).

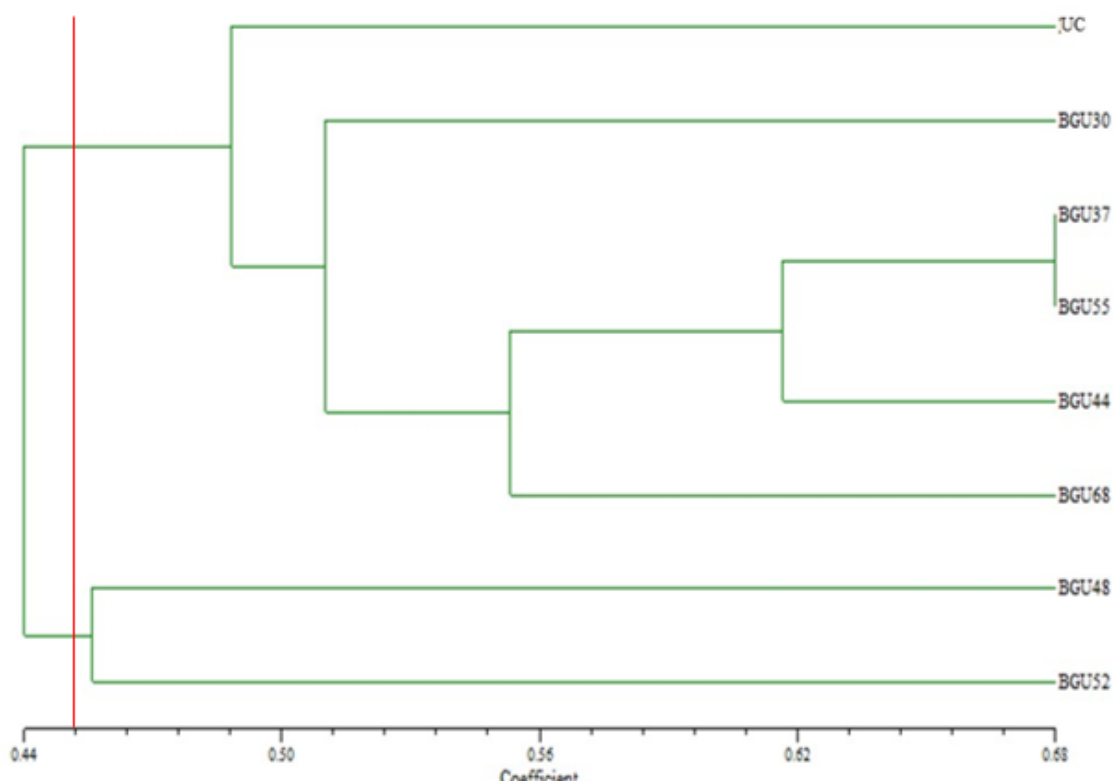
#### 4.3.2 Diversidade genética

A correlação cofenética foi de 0,86, indicando um agrupamento consistente no dendrograma obtido a partir dos indivíduos analisados. Valores de coeficiente de correlação cofenética maiores do que 80% são indicadores da consistência nos valores de similaridade genética, conferindo maior confiabilidade do agrupamento do método UPGMA (SOKAL e ROHLF, 1962). Em outras espécies do gênero *Spondias*, coeficientes de correlação cofenética também foram reportados com valores semelhantes aos encontrados neste estudo (LEDO et al. 2016; LIMA et al. 2011, SANTOS et al. 2008).



Os indivíduos apresentaram similaridade entre 0,31 e 0,65. Sendo os de maior dissimilaridade os indivíduos umbu comum e BGU48 e BGU52, os mais semelhantes os indivíduos BGU37 e BGU55 (Fig.2). Santana et al. (2011) encontraram valores semelhantes de dissimilaridade genética entre os 17 acessos de umbu-cajazeira, que variaram de 0,247 a 0,665. Comportamento divergente ocorreu em *S. mombin* que apresentou dissimilaridades genéticas muito baixas, entre 0,034 e 0,189 (OLIVEIRA et al. 2016).

No dendograma os indivíduos foram agrupados em dois grupos: grupo I: umbu comum e BGUs 30, 37, 44, 55 e 68, e no grupo II: BGUs 48 e 52. O grupo I apresentou o maior número de indivíduos, compreendendo 75% dos indivíduos, mesmo sendo indivíduos distintos, apresentam maior similaridade.



**Figura 2.** Dendrograma representativo da divergência genética entre os oito acessos de umbuzeiro (*S. tuberosa*) em policruzamentos, obtido pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), utilizando o complemento aritmético do índice de Jaccard como medida de dissimilaridade, com base em marcadores SSR (Simple Sequence Repeats). Valor cofenético = 0,85.

Santana et al. (2011), ao estudarem a variabilidade genética entre 17 acessos de umbu-cajazeira, reportaram a existência de uma considerável variabilidade genética entre os acessos, por meio de marcadores ISSR, onde constataram a existência de uma grande variabilidade genética entre os acessos, a qual pode ser explorada para a conservação e o melhoramento da espécie. Lima et al. (2011) também reportaram a presença de grande variabilidade genética entre 32 acessos de cajá da Coleção Germoplasma da Embrapa Meio-Norte pela técnica RAPD.

Os parentais apresentaram grande diversidade, indicando a possibilidade da obtenção de progênies, em policruzamentos, com bom potencial para o desenvolvimento de cultivares inéditas do umbuzeiro.

#### **4.3.3 Análise de paternidade**

Nas 20 progênies do BGU 30 foram identificados parentais masculinos em 17 progênies, duas progênies resultantes de autofecundações e apenas um com parental masculino desconhecido, com base nos marcadores microssatélites (Tabela 2). Em arroz, marcadores microssatélites foram utilizados para confirmar 11 híbridos, assim como determinar suas linhas parentais. Como resultado, foi possível diferenciar todos os híbridos, indicando que podem ser usados como marcadores de referência para a identificação e proteção de híbridos (NANDAKAUMAR et al. 2000). Percentuais altos de identificação de paternidade também foram reportados em cana-de-açúcar, entre 79 e 99% nas progênies avaliadas (TEW e PAN, 2010).

O BGU 37 foi o parental com maior número de progênies, sete, e os BGUs 68, 44 e 48, de maior tamanho de fruto, cada um com uma progênie (Tabela 2). Essas progênies resultantes de cruzamentos com fruto de maior tamanho são de grande interesse para o melhoramento e são, até o momento, inéditas para o umbuzeiro. A identificação do progenitor masculino mais provável contribui significativamente para o programa de melhoramento, pois pode sinalizar potenciais combinações favoráveis que podem ser exploradas na forma de cruzamentos biparentais (XAVIER et al. 2014).

Das 20 progênies que constituíram a população, 18 foram resultados de polinização cruzada, ou seja, 90% do total da população. Santos et al. (2011)

estimaram a taxa de polinização cruzada em umbuzeiro em 80%, valor próximo ao observado nas progênies do BGU 30 neste trabalho.

**Tabela 2.** Progênies da planta maternal BGU 30 e provável progenitor masculino, em esquema de policruzamentos de acessos de umbuzeiro.

<b>Indivíduos</b>	<b>Prováveis pais</b>	<b>Indivíduos</b>	<b>Prováveis pais</b>
1	48	11	Não definido
2	Autofecundação	12	37, 44, 55
3	55	13	37
4	UC	14	44, 55
5	UC	15	37
6	68	16	Autofecundação
7	37,44,55	17	37, 55
8	44	18	37
9	UC, 55	19	37
10	37	20	37

Nas progênies do BGU 37 foram identificados 14 progenitores masculinos e uma progênie resultante de autofecundação (Tabela 3). O grande número de progênies sem progenitor masculino definido pode ser atribuído à localização da planta materna BGU 37, próxima ao BGU 24, não incluído na presente genotipagem, por não fazer parte do ensaio de competição de clones do umbuzeiro.

**Tabela 3.** Progênies da planta maternal BGU 37 e provável progenitor masculino, em esquema de policruzamentos de acessos de umbuzeiro.

<b>Indivíduos</b>	<b>Prováveis pais</b>	<b>Indivíduos</b>	<b>Prováveis pais</b>
1	Não definido	23	Não definido
2	Não definido	24	Não definido
3	Não definido	25	Não definido
4	UC	26	Não definido
5	Não definido	27	Não definido
6	Não definido	28	UC
7	Não definido	29	Não definido
8	UC	30	55
9	Não definido	31	Não definido
10	UC	32	Não definido
11	Não definido	33	Não definido
12	Não definido	34	Não definido
13	UC	35	52
14	UC	36	Não definido
15	UC	37	52
16	UC	38	Não definido
17	Não definido	39	30
18	Não definido	40	Não definido

19	Não definido	41	Autofecundação
20	UC	42	Não definido
21	Não definido	43	Não definido
22	44	44	Não definido

Das progênies híbridas da planta maternal do BGU 37 identificadas, o parental UC foi o maior contribuinte para a paternidade. Esse protagonismo do umbu comum pode ser explicado, pois cada cultivar tem suas variações e pode produzir maior quantidade de pólen, desta forma diminuindo a concorrência com as demais plantas vizinhas (MELLONI, 2012).

#### 4.4 CONCLUSÃO

A utilização de locos SSR permitiu a identificação dos progenitores masculinos em 85% das progênies do BGU30 e 32% dos progenitores masculinos das progênies do BGU37, indicando que a técnica do policruzamento é adequada para obtenção de híbridos em umbuzeiro.

Progênies resultantes do cruzamento dos BGUs 69, 44 e 48 com o BGU 30 são inéditos e são de grande interesse para o melhoramento, pois resultam de progenitores masculinos com maior tamanho de fruto.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR-BARAJAS, E. et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in *Spondias radlkoferi* (Anacardiaceae). **Applications in plant sciences**, v. 2, n. 11, p. 1400079, 2014.

ALMEIDA, C.C.S.; CARVALHO, P.C.L.; GUERRA, M. Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid umbu-cajá (Anacardiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 155, p. 541–547, 2007.

ANDERSEN, O.; ANDERSEN, V. U. As frutas silvestres brasileiras. Rio de Janeiro: Globo, p. 195-197, 1988.

BALBINO, E. et al. Genome survey and development of 18 microsatellite markers to assess genetic diversity in *Spondias tuberosa* Arruda Câmara (Anacardiaceae) and cross-amplification in congeneric species. **Molecular biology reports**, p. 1-7, 2019.

BOLSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.

COSTA, S. R.; SANTOS, C. A. F. Allelic database and divergence among *Psidium* accessions by using microsatellite markers. **Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2013.

CRESTE, S.; NETO, A. T.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 4, p. 299-306, 2001.

DANTAS-JÚNIOR, O. R. Qualidade e capacidade antioxidante total de frutos de genótipos de umbuzeiro oriundos do Semi-Árido nordestino. **Areia, PB: UFPB**, 2008.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, n.12, p.013-15, 1987.

FUKUDA, W. M. G. e IGLESIAS, C. Melhoramento genético. In: SOUZA, L. S.; FARIAS, A. R.; MATTOS, P. L. P.; FUKUDA, W. M. G. (Eds.). **Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 325-363.

GOIS, I. B.; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R. A. Variabilidade genética de *Spondias lutea* L. em uma população do Baixo São Francisco sergipano, por meio de isoenzimas. **Scientia Forestalis**, 2009.

GRATTAPAGLIA, D.; FERREIRA, M. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **EMBRAPA, Brasília**, v. 3, 1998.

HITTLE, C. N. A Study of the Polycross Progeny Testing Technique as Used in the Breeding of Smooth Bromegrass 1. **Agronomy Journal**, v. 46, n. 11, p. 521-523, 1954.

KALINOWSKI, S.T. et al. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v.16, n.5, p.1099-1106, 2007.

LEDO, C. A. S.; MACHADO, C. de F.; RITZINGER, R. Diversidade genética e correlações fenotípicas para caracteres de frutos em acessos de *Spondias* sp. In: **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 24., 2016, São Luis. Fruteiras nativas e sustentabilidade: anais. São Luis: SBF, 2016., 2016.

LIMA, A. T. B. et al. Molecular characterization of caja', *Spondias mombin* (Anacardiaceae), by RAPD markers. **Embrapa Meio-Norte-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2011.

MACHADO, I. C.; LOPES, A. V.; SAZIMA, M. Plant sexual systems and a review of the breeding system studies in the Caatinga, a Brazilian tropical dry forest. **Annals of Botany**, v. 97, n. 2, p. 277-287, 2005.

MELLONI, M. L. G. Fisiologia do florescimento e viabilidade do grão-de-pólen da cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*). 2012.

MOURA, T. M. et al. Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanum spp* do Cerrado, estimadas por meio de locos microsatélites. In: **Sci. Forum**. 2009. p. 143-150.

NANDAKUMAR, N. et al. Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers. **Euphytica**, v. 136, n. 3, p. 257-264, 2004.

OLIVEIRA, D. A. et al. Diversidade genética entre acessos de taperebazeiro (*Spondias mombim* L.) do banco ativo de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental com uso de marcadores ISSR. In: **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 20.; SEMINÁRIO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 4., 2016, Belém, PA. Anais. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2016., 2016.

OLIVEIRA, V. R. et al. *Spondias tuberosa*: Umbu. **Embrapa Semiárido-Capítulo em livro técnico (INFOTECA-E)**, 2018.

POEHLMAN, J.M; SLEPER, D.A. **Breeding Field Crops**. 4.Ed. Ames: Iowa State University Press, 494p. 1995.

PRADO, D. E.; GIBBS, P. E. **Patterns of species distribution in the dry seasonal forests of South America**. Annals of the Missouri Botanical Garden 80: 902-927, 1993.

ROHLF, F. J. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, User Guide. **New York University**, New York, 2000.

SANTANA, I. B. B. et al. Variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 868-876, 2011.

SANTOS, C. A. F.; NASCIMENTO, CE de S.; CAMPOS, C. de O. Preservação da variabilidade genética e melhoramento do umbuzeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n.2, p. 104-109, 1999.

SANTOS, C. A. F.; RODRIGUES, M. A.; ZUCCHI, M. I. Variabilidade genética do umbuzeiro no Semi-Árido brasileiro, por meio de marcadores AFLP. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 8, p. 1037-1043, 2008.

SANTOS, C. A. F., et al. Estimativas de polinização cruzada em população de *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae) usando marcador AFLP. **Revista Árvore**, v. 35, n. 3, p. 691-697, 2011.

SANTOS, C. A. F.; GAMA, R. N. C. S. AFLP estimation of the outcrossing rate of *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae), an endemic species to the Brazilian semiarid region. **Revista de biologia tropical**, v. 61, n. 2, p. 577-582, 2013.

SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y.; SIQUEIRA, A.C.M.F.; ZANATTO, A.C.S. Sistema de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* Mart. O. Ktze.:

implicações para a conservação e o melhoramento genético. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.58, p.25- 40, 2000.

SILVA, S. de M.; ALVES, R. E. Desenvolvimento e fisiologia da maturação de frutos do gênero *Spondias*. \_\_\_\_ **Spondias no Brasil: umbú, cajá e espécies afins**. Recife: **Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, IPA/UFRPE**, 2008.

SILVA, B. M. et al. Genetic diversity of Cajazeira (*Spondias mombin* L.) in three geographic regions. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, p. 1-11, 2017.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v. 11, n. 2, p. 33-40, 1962.

TEW, T. L.; PAN, Y. B. Microsatellite (simple sequence repeat) marker-based paternity analysis of a seven-parent sugarcane polycross. **Crop Science**, v. 50, n. 4, p. 1401-1408, 2010.

TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações. **Editora SBG Sociedade Brasileira de Genética**. **Ribeirão Preto, SP**, v. 181, 94 p. 2017.

XAVIER, M. A. et al. Paternity identification in sugarcane polycrosses by using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, p. 2268-2277, 2014.

## CAPÍTULO III

### DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM UMBUZEIRO BASEADOS EM LOCOS MICROSSATÉLITES

Viviane Nunes dos Santos<sup>1</sup>, Carlos Antônio Fernandes Santos<sup>2</sup>, Viseldo Ribeiro de Oliveira<sup>2</sup>, Antônio Elton da Silva Costa<sup>3</sup>, Fabrício Francisco Santos da Silva<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Mestranda do programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, email: [viviane7414@gmail.com](mailto:viviane7414@gmail.com) <sup>2</sup> Pesquisador Embrapa Semiárido, email: [carlos-fernandes.santos@embrapa.br](mailto:carlos-fernandes.santos@embrapa.br); [viseldo@cpatsa.embrapa.br](mailto:viseldo@cpatsa.embrapa.br) <sup>3</sup>Doutorando do programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas, Universidade Federal Rural do Pernambuco, email: [antonioelton.agro@hotmail.com](mailto:antonioelton.agro@hotmail.com) <sup>4</sup>Doutor em Recursos Genéticos Vegetais, email: [fabriciofrancisco2006@gmail.com](mailto:fabriciofrancisco2006@gmail.com)

### RESUMO

O umbuzeiro é uma planta frutífera, endêmica do Semiárido brasileiro, com grande potencial para o ramo da fruticultura. Os objetivos do presente estudo foram estimar a diversidade e estrutura genética em acessos de *Spondias tuberosa* procedentes de quatro regiões do Semiárido brasileiro com base em 10 locos microssatélites, para orientar trabalhos de recursos genéticos com a espécie. DNA foi extraído pelo método do CTAB 2x de amostras foliares de 24 acessos de umbuzeiro disponíveis no banco de germoplasma da espécie, localizado na Embrapa Semiárido. O dendograma UPGMA, gerado com a matriz de similaridade do coeficiente de Jaccard, resultou na formação de quatro grupos, no ponto de corte de 0,44. O coeficiente de similaridade variou de 0,30 a 0,84 indicando grande divergência entre os acessos. A análise bayesiana, obtida através do software Structure, sugere duas subpopulações, uma formada pela região de Januária e a outra pelas regiões de Juazeiro, Uauá e Petrolina. O valor de  $F_{ST}$  de 0,12 da análise molecular de variância indica moderada diferenciação genética entre as populações das quatro procedências de umbuzeiro, sugerindo que a variabilidade genética das populações de umbuzeiro está moderadamente estruturada em função da procedência. No conjunto as análises indicam que a diversidade genética do umbuzeiro não está uniformemente distribuída nas regiões estudadas, sendo recomendado a coleta de germoplasma de maior número de populações para ampliar diversidade genética da espécie.

**Palavras-chave:** *Spondias tuberosa*, diversidade genética, SSR.



## ABSTRACT

Umbuzeiro is a fruit plant, endemic to the Brazilian semiarid region, with great potential for the fruit industry. The objectives of the present study were to estimate the diversity and genetic structure in accessions of *Spondias tuberosa* from four regions of the Brazilian Semiarid based on 10 microsatellite loci, to guide work on genetic resources with the species. DNA was extracted by the CTAB method 2x from leaf samples of 24 accessions of umbuzeiro available in the germplasm bank of the species, located at Embrapa Semiárido. The UPGMA dendrogram, generated with the Jaccard coefficient similarity matrix, resulted in the formation of four groups, at the cut-off point of 0.44. The similarity coefficient ranged from 0.30 to 0.84, indicating a great divergence between accessions. The Bayesian analysis, obtained through the Structure software, suggests two subpopulations, one formed by the region of Januária and the other by the regions of Juazeiro, Uauá and Petrolina. The  $F_{ST}$  value of 0.12 in the molecular analysis of variance indicates moderate genetic differentiation between the populations of the four umbuzeiro origins, suggesting that the genetic variability of the umbuzeiro populations is moderately structured according to the origin. As a whole, the analyzes indicate that the umbuzeiro's genetic diversity is not evenly distributed in the studied regions, and the collection of germplasm from a larger number of populations is recommended to increase the genetic diversity of the species.

**Keywords:** *Spondias tuberosa*, genetic diversity, SSR.

## 5.1 INTRODUÇÃO

O Semiárido brasileiro apresenta grande riqueza em sua flora, sendo que o gênero *Spondias* destaca-se nessa região, pois apresenta diversas espécies que ocorrem de forma espontânea ou subespontânea, como a cajazeira (*S. lutea* L.), cerigueleira (*S. purpurea* L.), cajá-mangueira ou cajaraneira (*S. cytherea* Sonn.), umbuguela (*Spondias* sp.), umbucajazeira (*Spondias* sp.) e o umbuzeiro (*S. tuberosa*) (PIRES, 1990). Essa última espécie é de grande relevância para esta região devido ao seu potencial produtivo, associado à sua resistência nos períodos de estiagem.

Os frutos do umbuzeiro são aproveitados para diversas finalidades, desde o consumo *in natura* até a produção de doces, sucos, geleias, dentre outros subprodutos. Além das potencialidades comerciais, o umbuzeiro também merece atenção devido seus compostos bioativos, como a presença de compostos fenólicos, carotenoides, flavonoides, vitamina C, dentre outros, que apresentam efeitos positivos para o organismo (SILVA e ALVES, 2008). Dantas Junior (2008), estudando a capacidade antioxidante do umbuzeiro em diferentes genótipos do Semiárido brasileiro, constatou que os frutos de umbuzeiro são altamente ricos em vitamina C, com conteúdo superior a 50 mg.100g<sup>-1</sup>.

A maior parte da variabilidade genética do umbuzeiro encontra-se distribuída nessa região Semiárida. Santos et al. (2008) estudando a variabilidade genética do umbuzeiro, por meio de marcadores AFLP na região Semiárida, encontraram alta variabilidade dentro de populações, indicando a possibilidade da exploração da diversidade genética no melhoramento da espécie. Entretanto, a falta de estudos e trabalhos voltados a explorar a variabilidade genética do umbuzeiro são limitantes à sua exploração agrônômica. Ramos et al (2008) reportaram 80 acessos de umbuzeiro na Embrapa Semiárido, sendo essa a única coleção disponível para estudos de diversidade genética visando o melhoramento da espécie.

A utilização dos marcadores moleculares tem sido cada vez mais empregada em estudos genéticos, devido à sua grande contribuição e ampla aplicação, como em estudos de diversidade genética, paternidade, filogeografia, filogenia etc. (TURCHETTO et al, 2017). Os marcadores microssatélites ou 'single sequence repeats (SSR) por sua vez, devido à sua facilidade de uso, codominância, multialelismo e alta reprodutibilidade, tem sido muito utilizado. Para o umbuzeiro

Balbino et al. (2019) desenvolveram 18 marcadores SSR, enquanto Aguilar-Bajaras et al. (2014) publicaram 14 sequências de SSR para *S. radkolferi*, que podem ser transferidas para o umbuzeiro, já que a transferibilidade tem sido uma técnica reportada com sucesso entre espécies.

O objetivo do presente estudo foi estimar a diversidade e a estrutura genética em acessos de *Spondias tuberosa*, procedentes de quatro regiões do Semiárido brasileiro e disponíveis no Banco de germoplasma de umbuzeiro da Embrapa Semiárido, para orientar trabalhos de recursos genéticos com a espécie.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Material vegetal, extração e quantificação do DNA

Amostras de folhas jovens e sadias de 24 acessos procedentes de quatro regiões do Semiárido brasileiro (Tabela 1), foram coletadas no Banco de Germoplasma de umbuzeiro localizado na Embrapa Semiárido em Petrolina-PE. O material vegetal foi devidamente identificado e acondicionado em caixas de isolamento térmico, a baixas temperaturas, até a chegada no laboratório.

**Tabela 1.** Identificação, procedência, latitude e longitude de acessos no Banco de Germoplasma de Umbuzeiro da Embrapa Semiárido.

Identificação no BAG	Procedência	Latitude	Longitude
BGU01	Juazeiro- BA	09°. 50'.10.0"	40°.14'11.7"
BGU05	Juazeiro- BA	09°.51'56.2"	40°.12'54.1"
BGU07	Juazeiro- BA	09°.50'.38.0"	40°.14'16.2"
BGU16	Juazeiro- BA	09°.49'29.7"	40°.14'10.4"
BGU41	Juazeiro- BA	09°.37'01.1"	39°.49'22.2"
BGU42	Juazeiro- BA	09°.34'.52.6"	39°.58'49.1"
BGU56	Januária- MG	15°.29'.10"	44°.21'.39"
BGU58	Januária- MG	15°.29'.13"	44°.21'.49"
BGU59	Januária- MG	15°.29'.25"	44°.21'.37"
BGU60	Januária- MG	15°.25'.17"	44°.18'.34"

BGU61	Januária- MG	15°.22'.02"	44°.19'37"
BGU62	Januária- MG	15°.29'.06.9"	44°21'.27.7"
BGU28	Uauá- BA	09°.48'.16.9"	39°.33'.56.5"
BGU31	Uauá- BA	09°.46'.19.4"	39°.38'.41.5"
BGU32	Uauá- BA	09°.46.26.1"	39°.40'.01.5"
BGU35	Uauá- BA	09°.47'.04.3"	39°.39'.30.5"
BGU37	Uauá- BA	09°.44'.43.5"	39°.41'.16.5"
BGU38	Uauá- BA	09°.44'.31.7"	39°.39'.56.6"
BGU12	Petrolina- PE	08°.28'.13.5"	40°.48'.08.2"
BGU13	Petrolina- PE	08°.27'.30.4"	40°.47'.27.2"
BGU14	Petrolina- PE	08°.27'.33.3"	40°.47'.26.2"
BGU22	Petrolina- PE	09°.9'.18.3"	40°.25'.52.6"
BGU39	Petrolina- PE	09°.9'.05.1"	40°.22'.41.7"
BGU40	Petrolina- PE	09°.9'.16.8"	40°.22'.22.0"

A extração do DNA foi realizada com base no protocolo de CTAB 2X (DOYLE & DOYLE, 1987), com algumas alterações: Os tecidos vegetais para obtenção do DNA total foram macerados em nitrogênio líquido e cada respectiva amostra transferida para tubos eppendorf de 2 mL, contendo 950 µL de CTAB 2%. Os tubos foram levados ao banho maria a 60°C por 30 min, sendo invertidos a cada 10 min. Finalizado este processo as amostras foram deixadas cinco minutos em temperatura ambiente e em seguida adicionados 950 µL da mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguida de centrifugação a 10000 rpm por 10 min. 700 µL do sobrenadante foram aliqüotados para tubos eppendorf de 1,5 mL e 466 µL de álcool isopropílico gelado foram adicionados, sendo os tubos suavemente invertidos e mantidos em gelo por 20 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 min, até a formação de um pellet no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado, sendo adicionados 400 µL de etanol a 70%, seguido de centrifugação a 12000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e 400 µL de etanol a 98% foi adicionado, seguido de centrifugação rápida, sendo o sobrenadante derramado suavemente, deixando-se o pellet de DNA à temperatura ambiente até estar completamente seco. O pellet de DNA foi ressuspensão em TE (10 Mm Tris- HCl e 1 Mm EDTA, Ph 8). A quantificação do DNA

foi obtida através da análise visual comparativa das amostras em gel de agarose 0,8% (p/v), corado com brometo de etídio e padronizadas em 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ .

### 5.2.2 Reações de amplificação

As reações de amplificação foram realizadas utilizando 10 oligonucleotídeos iniciadores (primers), sendo quatro desenvolvidos por Aguilar-Bajaras et al. (2014) e seis por Balbino et al. (2019) (Tabela 2). As reações de PCR (Polymerase Chain Reaction) foram ajustadas para um volume final de 10  $\mu\text{L}$ , contendo: 1  $\mu\text{L}$  de tampão 10x, 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,22  $\mu\text{M}$  de cada dNTP; 0,4  $\mu\text{M}$  de cada primer (“forward” e “reverse”), uma unidade de *Taq* DNA polimerase e 10 ng de DNA genômico.

As amplificações foram realizadas em termociclador Biometra, com o programa proposto por Aguilar-Bajaras et al. (2014): 15 min a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min 30 s a 59 ou 60°C e 1 min a 72 °C e finalizando com uma etapa de 10 min a 72 °C para a extensão da fita. Os produtos da amplificação foram observados através da utilização do gel de poliacrilamida a 6% de concentração, conforme metodologia descrita por Costa e Santos (2013), corado com nitrato de prata (CRESTE et al. 2001).

### 5.2.3 Polimorfismo e análise de agrupamento

Para analisar o padrão alélico de cada indivíduo de *S. tuberosa*, o número de pares de bases (bp) para cada alelo foi estimado usando o método da mobilidade inversa, baseado na regressão de produtos de tamanho conhecido de marcador molecular de 50 pb (Ludwig Biotec®). Os microssatélites foram analisados quanto à presença alélica (1) e ausência (0) para construir uma matriz de similaridade do índice Jaccard. Um dendrograma foi gerado usando o método de agrupamento UPGMA (não ponderado, com base na média aritmética). O dendrograma foi testado usando a correlação cofenética. Foi utilizado o programa NTSYSpc (ROHLF, 2009) nessas análises.

#### 5.2.4 Análise da estrutura populacional

O agrupamento dos genótipos foi realizado pelo programa STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD et al. 2000), utilizando a cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), com 100.000 permutações e 100.000 simulações para inferências de 'cluster'.

Para cada valor de K (número de agrupamentos possíveis), foram realizadas dez execuções, quando execuções com os mesmos valores de K produziram resultados discrepantes, a regra da maioria foi usada para selecionar o resultado ideal (FRIEDLAENDER et al. 2008). A partir do STRUCTURE HARVEST (EARL e VON HOLDT 2012) foi calculado o valor de  $\Delta K$  para detectar a provável número de 'clusters' (EVANNO et al. 2005). Das 20 execuções independentes, aquela com o maior valor de  $\ln Pr(X | K)$  (probabilidade de log ou probabilidade) foi escolhida e representada como um gráfico de linhas.

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada pela decomposição da variação total dos componentes entre e dentro das populações, usando a distância euclidiana quadrada (EXCOFFIER et al. 1992). O significado dos parâmetros genéticos foi determinado pelo método de randomização (999 permutações).

O fluxo gênico ( $Nm$ ) foi estimado pelo número de migrantes, com base no parâmetro  $\Phi_{ST}$ , que é análogo ao  $F_{ST}$  (WRIGHT 1949; MEIRMANS e HEDRICK 2011). O programa GenAlEx 6.5 (SMOUSE et al. 2012) foi utilizado na AMOVA.

### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.3.1 Polimorfismo dos SSR

Todos os locos apresentaram um bom padrão de amplificação em gel de poliacrilamida a 6%. A diversidade alélica variou entre dois e sete alelos por loco, com média de 3,5 alelos por loco (Tabela 2). Cristóbal-Perez et al. (2019), avaliando a variabilidade genética em *S. purpurea* e usando 24 microssatélites, obtiveram média de 5,88 alelos. Silva et al. (2017) também encontraram alta diversidade alélica ao utilizarem marcadores ISSR para caracterizar a diversidade genética em *S. mombim*, com 6,97 alelos por loco.

Com exceção do TUB93, que apresentou valor de PIC pouco informativo de 0,195, os demais marcadores apresentaram PIC entre mediano a muito informativos, com os locos SPO4, SPO14 e TUB94 como os mais informativos (Tabela 2), de acordo com a classificação de Bolstein et al. (1965). Silva et al. (2017) ao estimarem a diversidade genética em *S. mombin* por meio de marcadores ISSR encontraram valores de PIC acima de 0,250 na maioria dos marcadores utilizados.

**Tabela 2.** Temperatura de anelamento ( $T_m$ ), Número de alelos (NA) e tamanho de bandas (TB), Heterozigosidade esperada (He), Heterozigosidade observada (Ho) e Conteúdo de informação polimórfica (PIC) de dez locos microssatélites avaliados em 24 indivíduos de *Spondias tuberosa* Arruda.

Nome do primer	Sequência dos primers 5' – 3'	Características em <i>S. tuberosa</i> Arr					
		$T_m$ (°C)	NA	TB	PIC	HE	HO
<b>SPO4</b>	F: CGCTAGTTGTCATTCGCGG R: GCTTAACCTCTGGAAAGTCGC	62	7	548 – 696	0,778	0,822	0,958
<b>SPO8</b>	F: GCAGCAGCCATTTGTGAAC R: CACGTGTTCCCAGTTATGATTTG	60	4	505 – 529	0,486	0,552	0,458
<b>SPO14</b>	F: ACACCAACGTTTGCGGAG R: TCTAGGTAGACAGCGACAAATC	62	3	640 - 707	0,575	0,662	0,500
<b>SPO18</b>	F: TCTATTTGCGTCCAGGTATTTTC R: GAATGGGCACGTTCCCTTGG	62	3	820-874	0,477	0,580	0,609
<b>TUB78</b>	F: TGC TCT GCC TTC CAA CAT GT R: GTA CGT GAG GGA CAA TGG GG	59	3	558-642	0,388	0,414	0,458
<b>TUB84</b>	F: CAC CTC CTA CGT TAC TGC CA R: TCA AAC TGG ATT CAG GCA TGC	59	2	580-613	0,359	0,479	0,333
<b>TUB93</b>	F: AGC CTT TTT GAG TCA CAT GCA R: ACA CTG ATG GTA CGT GAA CAA	60	2	570-624	0,195	0,223	0,167
<b>TUB94</b>	F: TGT CTG AGG ATC GAG ACG AGA R: GCA CGC GCT TAC TTA TGT TGG	60	3	689-767	0,522	0,600	0,542
<b>TUB98</b>	F: AGC GGA AAA GAA TGA TGA AGGC R: GTT GGC TTC TTT CTT GCG GC	60	4	647-683	0,474	0,554	0,667
<b>TUB103</b>	F: GGA GCA GTG AAA CCC CTG AA R: GTC CAG GTC GCC GTA AAG AA	60	4	519-533	0,357	0,392	0,292

A heterozigosidade esperada variou de 0,195 a 0,822 e a observada de 0,167 a 0,958. Balbino et al. (2018) encontraram valores de heterozigosidade esperada e observado similares aos obtidos nesse estudo, entre 0,158 e 0,607, e 0,170 e 0,781, respectivamente, em um estudo sobre o padrão filogeográfico de *S. tuberosa* usando sequências da região plastídica accD-psal e seis marcadores SSR em indivíduos oriundos de 20 localidades.

Nos marcadores SPO8, SPO14, TUB84, TUB93, TUB94 e TUB103, a heterozigosidade esperada foi maior que observada. CRISTÓBAL-PÉREZ, et al (2019) também encontraram valores de heterozigosidade esperada maiores que as esperadas, ao realizarem ensaios de amplificação cruzada em cinco espécies congênicas, a partir de locos SSR de *S. purpurea*.

### 5.3.2 Análise de agrupamento

O agrupamento dos 24 indivíduos apresentou coeficiente de correlação cofenética de 1,0 (Fig. 1), indicando que os dados são confiáveis e de que existe um bom ajuste entre as distâncias genéticas, a matriz original e a representação gráfica. A matriz de similaridade, variou de 0,115 a 0,842, indicando alta variabilidade para entre os indivíduos analisados (Fig. 1). Santana et al. (2011) relataram valores de similaridade entre 0,247 e 0,665 ao estimarem a variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR.

Com base na utilização dos marcadores microssatélites e a partir da matriz de similaridade dos acessos de umbuzeiro, foi possível separar quatro grupos, tomando-se como ponto de corte a distância média de 0,44. O mesmo padrão de agrupamento foi observado por Santana et al. (2011) ao estimarem a diversidade genética em 17 acessos de umbu-cajazeira, com 25 marcadores ISSR. Gois et al (2014) reportaram a formação de cinco grupos ao caracterizarem geneticamente, por meio de marcadores RAPD, 17 indivíduos de *S. lutea* (cajá).

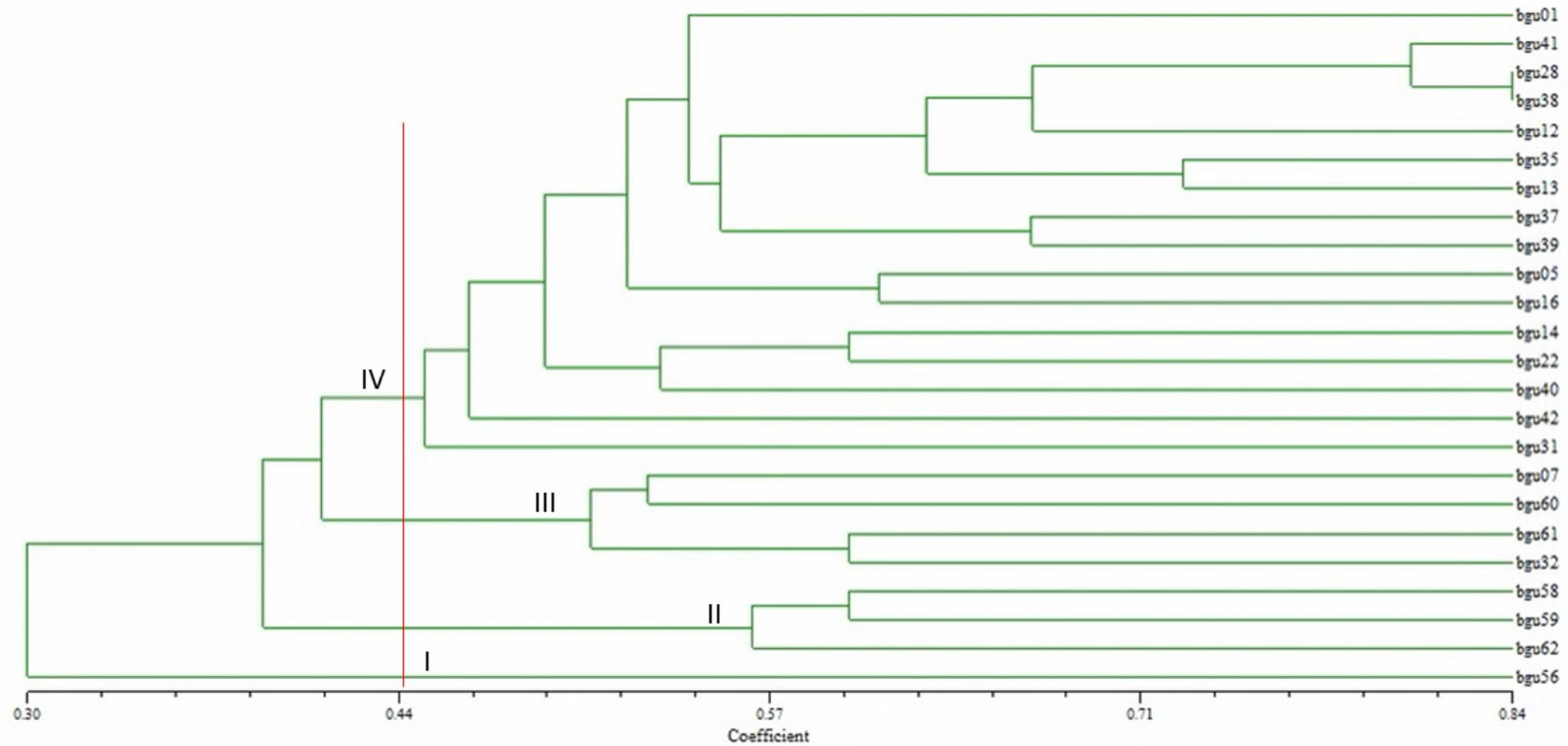
O grupo I foi formado pelo BGU56 (Januária); o grupo II com três acessos, BGU58, BGU59 e BGU62 (Januária), o grupo III formado pelos acessos BGU07, BGU32, BGU60 e BGU61 (Juazeiro, Uauá e Januária, respectivamente) e o grupo



IV com 16 acessos: BGU01, BGU05, BGU16, BGU41, BGU42 (Juazeiro); BGU28, BGU31, BGU35, BGU37 e BGU38 (Uauá) e os acessos BGU12, BGU13, BGU14, BGU22, BGU39 e BGU40 (Petrolina) (Figura 1).

A partir da divisão dos grupos é possível observar que apenas o acesso BGU56 permaneceu sozinho sem se agrupar a nenhum outro indivíduo. No segundo grupo apenas acessos de Januária-MG compuseram o grupo, estando essa região localizada na região Sudeste do país, distante das outras regiões analisadas. O grupo quatro reuniu o maior número de acessos, sendo composto por indivíduos das regiões de Juazeiro-BA, Uauá-BA e Petrolina-PE, que são relativamente próximas, da mesma região ecogeográfica, podendo-se inferir que a proximidade entre elas justifique o agrupamento.

Santos (1997), concluiu, com base em caracteres fenotípicos, que a variabilidade do umbuzeiro se encontra uniformemente distribuída no Semiárido brasileiro. Santos et al (2008), com base em marcadores AFLP, concluíram que a variabilidade genética do umbuzeiro não está uniformemente dispersa no Semiárido e que as barreiras geográficas ou as condições edafoclimáticas têm limitado o acasalamento e a frequência dos alelos entre as populações. O presente estudo também indica que a variabilidade do umbuzeiro não está uniformemente distribuída no semiárido, pois indivíduos de Januária formaram grupos quase exclusivos, enquanto os indivíduos de Uauá, Juazeiro e Petrolina foram quase todos agrupados no mesmo grupo.

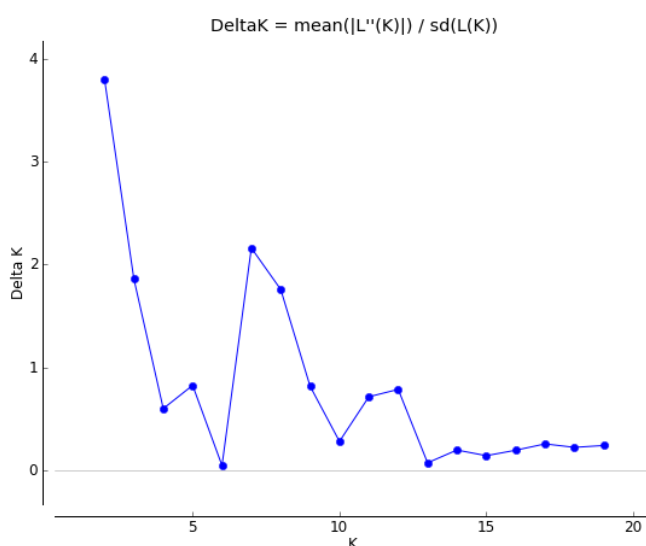


**Figura 1.** Dendrograma representativo da divergência genética entre os 24 acessos de *Spondias tuberosa*, obtido pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), utilizando o complemento aritmético do índice de Jaccard como medida de dissimilaridade, com base em marcadores SSR (Simple Sequence Repeats). Valor cofenético = 1,0

### 5.3.3 Estrutura Genética e Fluxo Gênico

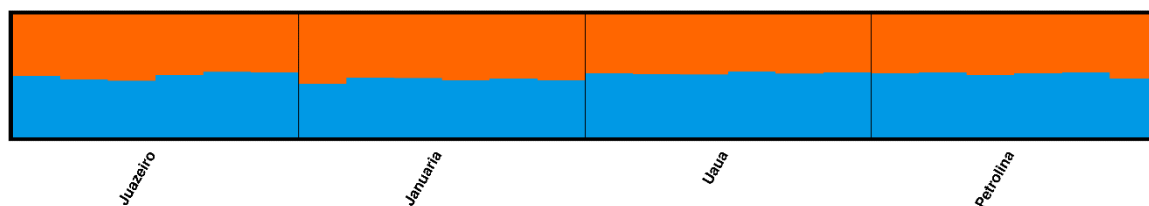
Foram identificados 2 grupos, com base no  $\Delta K$  ( $K = 2$ ) (Figuras 2 e 3). Balbino et al. (2018) também encontraram um  $K=2$ , ao estudarem o padrão filogeográfico de *S. tuberosa* usando sequências da região plastídica accD-psal e seis marcadores SSR em indivíduos oriundos de 20 localidades.

De acordo com Balbino et al. (2018), a Caatinga é um refúgio contínuo de espécies, no entanto, à medida que chega na região sudeste da Caatinga esse refúgio tende a ser menor. A partir do agrupamento obtido pelas matrizes de similaridade, é possível observar grupo com três acessos, BGU58, BGU59 e BGU62 exclusivos da região de Januária- MG, que fica localizada na região Sudeste do Semiárido.



**Figura. 2** Delta K, calculado com a taxa média de variação de segunda ordem da probabilidade de K dividido pelo desvio padrão da probabilidade K.

Os resultados na análise bayesiana indicaram a existência de apenas dois grupos, que podem ser identificados como três acessos de Januária em um grupo e os demais acessos de Uauá, Juazeiro e Petrolina em outro grupo (Figura 3). Esses dois grupos podem ser visualizados no ponto de corte de 0,44 no dendrograma UPGMA (Figura 1), que resultou em quatro grupos. Costa e Santos (2017) também reportaram concordância entre análises UPGMA e análise bayesiana ao analisarem acessos de *Psidium* com SNPs.



**Figura. 3** Estrutura genética de 24 acessos de umbuzeiro, de quatro regiões, gerados com base em análises bayesianas, considerando  $K = 2$ , obtido pelo método  $\Delta K$ , a partir de 20 simulações independentes para cada número de agrupamentos possíveis ( $k$ ).

Através da análise molecular de variância, com base nos 24 indivíduos oriundos das quatro populações distintas, verificou-se que apenas 12% da variabilidade genética está entre as populações e 88% da variabilidade está dentro das populações (Tabela 3). Balbino et al. (2018) encontraram 76,95% de variabilidade genética entre populações de *S. tuberosa*. De acordo com Paiva (1998), em populações naturais de plantas em regiões tropicais a maior parcela da variabilidade genética encontra-se preservada dentro das populações.

**Tabela 3.** Análise de variância molecular (AMOVA) e fluxo gênico estimado ( $N_m$ ) nas populações de umbuzeiro, calculadas pelo método de Wright (1949)

Fonte de variação	GL	SQ	QM	P	Porcentagem total de variação		
					$\Phi$ Estatística	$N_m^b$	
<b>Entre populações</b>	3	27,833	9,278	<0,001	12%	$\Phi_{ST} = 0,12$	1,865
<b>Dentro das populações</b>	20	102,833	5,142	<0,001	88%	$1 - \Phi_{ST} = 0,88$	
<b>Total</b>	23	130,667					

P=Probabilidade baseada em 999 permutações; b  $N_m = [(1 - \Phi_{ST}) / (4 \Phi_{ST})]$

Segundo Wright (1978), valores de  $F_{ST}$  acima de 0,25 indicam altos níveis de diferenciação genética, sendo que o valor de  $F_{ST}$  de 0,12 indica diferenciação moderada. Santos et al. (2008) estudaram a distribuição da variabilidade genética do umbuzeiro no Semiárido brasileiro, por meio de marcadores AFLP, reportaram alta

diferenciação genética ( $F_{ST} = 0,3138$ ) sugerindo que esta espécie apresenta fluxo restrito, com menos que um migrante por geração ( $N_m = 0,567$ ) e grande variabilidade entre as populações.

Silva et al. (2009) estimaram a diversidade e a estrutura genética de populações de cajazeiras na Zona da Mata do Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil, por meio da análise do polimorfismo isoenzimático e encontraram valores de  $N_m$  de 5,27, valor divergente ao encontrado nesse estudo.

#### 5.4 CONCLUSÃO

O valor de  $F_{ST}$  de 0,12 indica moderada diferenciação genética entre as populações das quatro procedências de umbuzeiro, sugerindo que a variabilidade genética das populações de umbuzeiro está moderadamente estruturada em função da procedência.

A maior parte da variabilidade genética foi encontrada dentro das populações.

A diversidade genética do umbuzeiro não está uniformemente distribuída nas regiões estudadas.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR-BARAJAS, E. et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in *Spondias radlkoferi* (Anacardiaceae). **Applications in plant sciences**, v. 2, n. 11, p. 1400079, 2014.

BALBINO, E. et al. Genome survey and development of 18 microsatellite markers to assess genetic diversity in *Spondias tuberosa* Arruda Câmara (Anacardiaceae) and cross-amplification in congeneric species. **Molecular biology reports**, p. 1-7, 2019.

BALBINO, E.; CAETANO, B.; ALMEIDA, C. Phylogeographic structure of *Spondias tuberosa* Arruda Câmara (Anacardiaceae): seasonally dry tropical forest as a large and continuous refuge. **Tree Genetics & Genomes**, v. 14, n. 5, p. 67, 2018.

BOLSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.

COSTA, S R.; SANTOS, C. A. F. Genetic divergence among *Psidium* accessions based on single nucleotide polymorphisms developed for *Eucalyptus*. **Genetics and molecular research**, v. 16, p. 1-9, 2017.

COSTA, S. R.; SANTOS, C. A. F. Allelic database and divergence among *Psidium* accessions by using microsatellite markers. **Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2013.

CRESTE, S.; NETO, A. T.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 4, p. 299-306, 2001.

CRISTÓBAL-PÉREZ, E. J. et al. Isolation and characterization of microsatellites loci in *Spondias purpurea* (Anacardiaceae) and cross amplification in congeneric species. **Molecular biology reports**, v. 46, n. 5, p. 5581-5585, 2019.

DANTAS JR, O. R. **Qualidade e capacidade antioxidante total de frutos de genótipos de umbuzeiro oriundos do semi-árido nordestino**. 2008. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Agronomia) -Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, n.12, p.013-15, 1987.

EARL, Dent A. et al. 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.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.

FRIEDLAENDER, J. S. et al. The genetic structure of Pacific Islanders. **PLoS genetics**, v. 4, n. 1, p. e19, 2008.

GOIS, Itamara Bomfim et al. Diversidade genética entre indivíduos de *Spondias lutea* L. procedentes do baixo São Francisco sergipano, por meio de marcadores RAPD. **Revista Árvore**, v. 38, n. 2, p. 261-270, 2014.

MEIRMANS, P. G.; HEDRICK, P. W. Assessing population structure: FST and related measures. **Molecular ecology resources**, v. 11, n. 1, p. 5-18, 2011.

PAIVA, J.R. **Melhoramento genético de espécies agroindustriais na Amazônia: estratégias e novas abordagens**. Brasília: Embrapa-SPI; Fortaleza: Embrapa-CNPAT, 135p. 1998.

PIRES, M. das G. de M. **Estudo taxonômico e área de ocorrência de *Spondias tuberosa* Arr.** Cam. no Estado de Pernambuco - Brasil. Recife, PEB, 1990. 289p. (Tese de Mestrado).

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

RAMOS, S.R.R.; QUEIROZ, M.A.; ROMÃO, R.L.; SILVA JÚNIOR, J.F. Germoplasma vegetal conservado no nordeste brasileiro: situação atual, prioridades e perspectivas. **Magistra**, v. 20, n. 3, p. 205-217, 2008.

ROHLF, F. J. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, User Guide. **New York University**, New York, 2000.

SANTANA, I. B. B. et al. Variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 868-876, 2011.

SANTOS, C. A. F. Dispersão da variabilidade fenotípica do umbuzeiro no semi-árido brasileiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** JCR, Brasília, v. 32, n.9, p. 923-930, 1997.

SANTOS, C. A. F.; RODRIGUES, M. A.; ZUCCHI, M. I. Variabilidade genética do umbuzeiro no Semi-Árido brasileiro, por meio de marcadores AFLP. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, Brasília, v.43, n.8, p.1037-1043, ago. 2008.

SILVA, B. M. et al. Genetic diversity of Cajazeira (*Spondias mombin* L.) in three geographic regions. **Genet. Mol. Res**, v. 16, p. 1-11, 2017.

SILVA, S. M.; ALVES, R. E. Desenvolvimento e fisiologia da maturação de frutos do gênero *Spondias*. \_\_\_\_ **Spondias no Brasil: umbú, cajá e espécies afins**. Recife: **Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, IPA/UFRPE**, 2008.

SILVA, Edson Ferreira da; MARTINS, Luiza Suely Semen; OLIVEIRA, Visêdo Ribeiro de. Diversidade e estrutura genética de populações em cajazeira (*Spondias mombin* L.) no nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 171-181, 2009.

SMOUSE, R. Peakalland PE; PEAKALL, R. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537-2539, 2012.

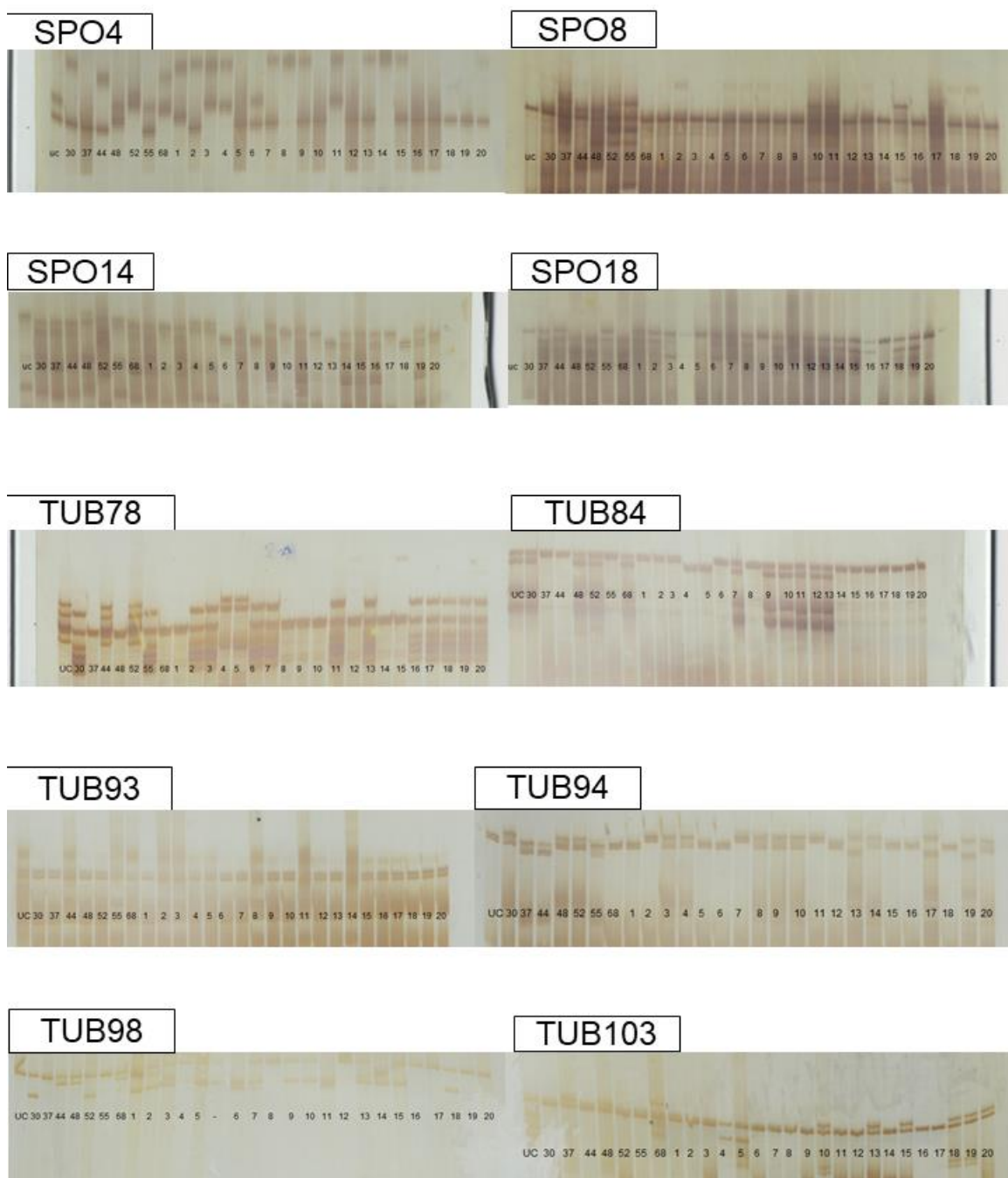
TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações. Editora **SBG Sociedade Brasileira de Genética**. **Ribeirão Preto, SP**, v. 181, 94 p. 2017.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of eugenics**, v. 15, n. 1, p. 323-354, 1949.

WRIGHT, S. **Evolution and genetics of populations**. Chicago: The University of Chicago Press, 1978. 465p.

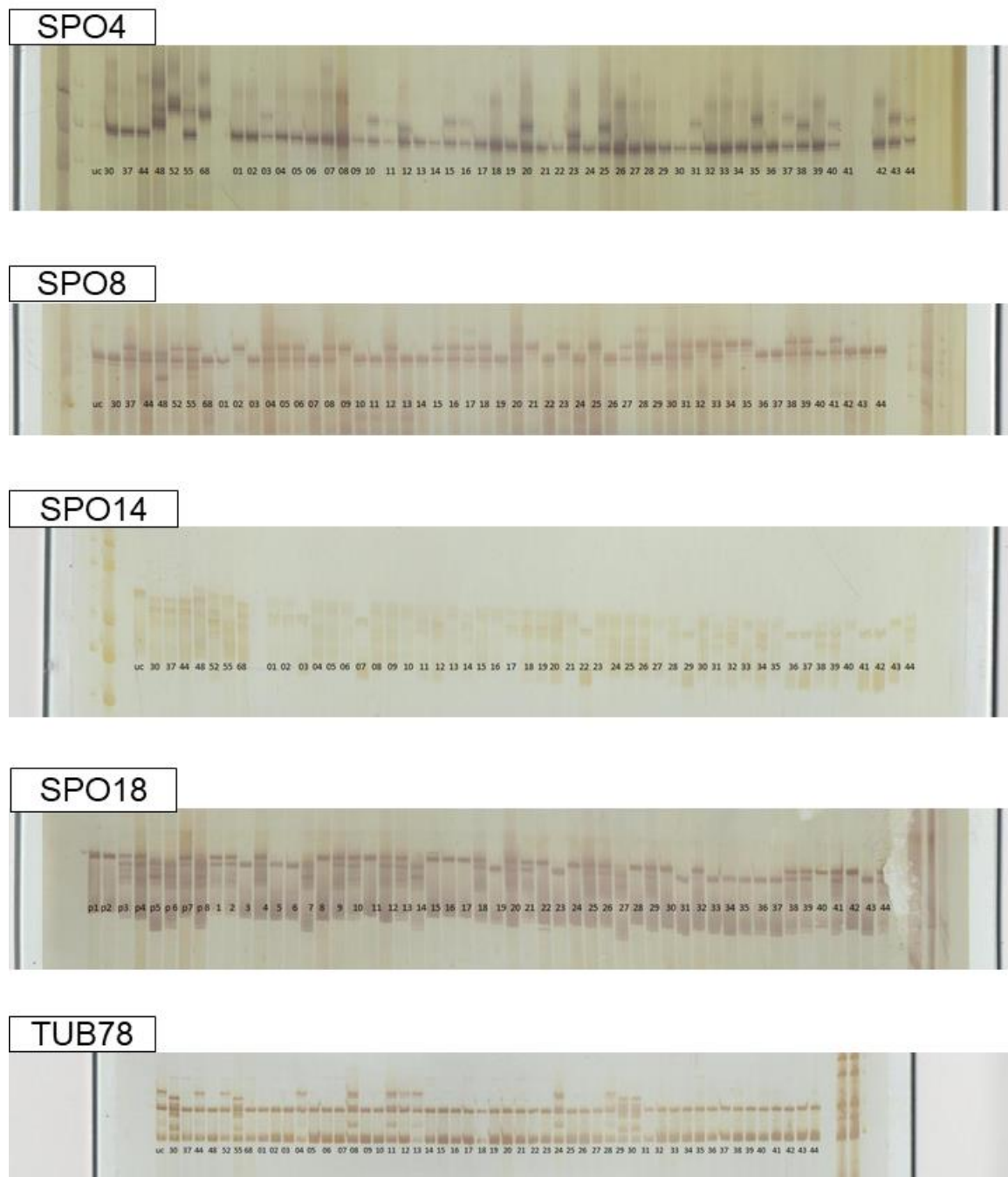
## ANEXOS

Em anexo é possível observar os produtos da amplificação dos marcadores microsatélites resultantes do policruzamento de duas populações, 30 e 37. E a distribuição dos alelos dos parentais e das progênies dos parentais BGU 30 e BGU37, Híbridos encontrados (H) e prováveis (p) pais.



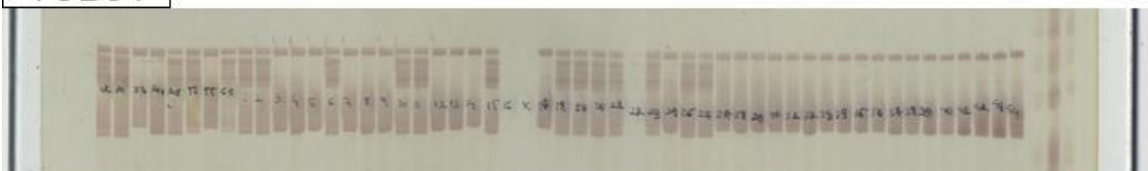


**Figura 1.** Produtos da amplificação dos marcadores microssatélites SSR na população 30 obtida pelo policruzamento com sete parentais.

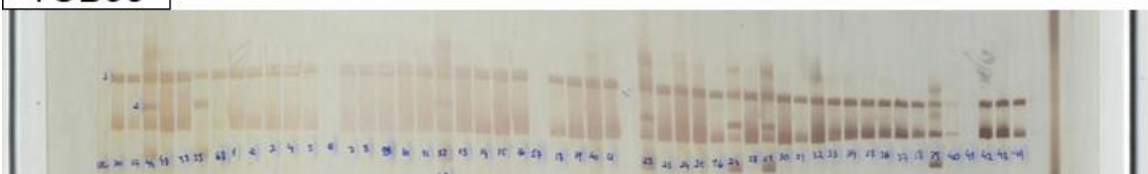


**Figura 2.** Produtos da amplificação dos marcadores microssatélites SSR na população 37 obtida pelo policruzamento com sete parentais.

TUB84



TUB93



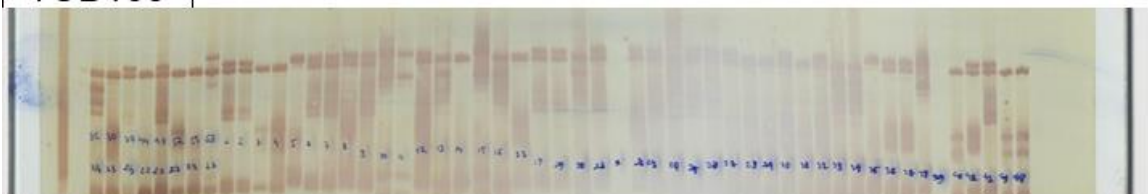
TUB94



TUB98



TUB103



**Figura 3.** Produtos da amplificação dos marcadores microssatélites SSR na população 37 obtida pelo policruzamento com sete parentais.

**Tabela 1.** Distribuição dos alelos dos parentais e da progênie do parental BGU 30 (1 a 20), Híbridos encontrados (H) e prováveis (p) pais.

IND	Marcadores microssatélites e distribuição alélica										H	P. Pais
	SPO4	SPO8	SPO14	SPO18	TUB78	TUB84	TUB93	TUB94	TUB98	TUB103		
UC	12	33	11	11	13	12	11	22	11	34		
30	32	33	23	11	23	12	11	12	13	33		
37	22	13	23	12	33	11	11	23	11	23		
44	42	23	23	12	13	11	12	23	12	33		
48	55	23	42	23	33	12	11	12	12	23		
52	66	13	13	23	13	12	11	12	13	33		
55	12	13	12	12	23	11	12	23	11	33		
68	41	33	23	12	33	12	11	22	12	13		
1	35	33	23	12	33	11	11	22	13	33	H	48
2	32	33	23	12	23	11	12	11	13	33	H	
3	31	33	23	12	23	11	12	12	13	33	H	55
4	31	33	12	11	12	22	11	12	11	34	H	UC
5	22	33	12	11	12	22	11	22	13	34	H	UC
6	12	33	33	12	23	11	11	22	13	13	H	68
7	32	33	23	12	23	12	11	12	13	33	H	37,44,55
8	32	33	33	12	33	11	12	12	11	33	H	44
9	32	33	13	12	33	12	11	12	13	33	H	uc,55,
10	22	13	22	12	33	12	11	12	13	23	H	37
11	31	13	23	12	23	12	12	11	33	33	H	ND
12	22	33	22	12	33	12	11	22	11	33	H	37,44,55
13	32	33	33	12	23	12	11	13	13	23	H	37
14	32	33	23	12	33	11	12	12	13	33	H	44,55
15	32	13	23	12	33	11	11	22	13	23	H	37
16	22	33	23	12	23	11	11	22	11	33		AF
17	22	13	22	11	23	11	11	13	11	33	H	37,55
18	22	33	33	12	23	11	11	22	13	23	H	37
19	22	33	23	12	23	11	11	13	11	23	H	37
20	32	33	33	11	23	11	11	12	13	23	H	37

**Legenda:** ND (Não definido); AF (Autofecundação).

**Tabela 2.** Distribuição dos alelos dos parentais e da progênie do parental BGU 37 (1 a 44), Híbridos encontrados (H) e prováveis (p) pais.

IND	Marcadores microssatélites e distribuição alélica										H	P. pais
	SPO4	SPO8	SPO14	SPO18	TUB78	TUB84	TUB93	TUB94	TUB98	TUB103		
UC	12	33	11	11	13	12	11	22	11	34		
30	32	33	23	11	23	12	11	12	13	33		
37	22	13	23	12	33	11	11	23	11	23		
44	42	23	23	12	13	11	12	23	12	33		
48	51	23	42	23	33	12	11	12	12	23		
52	66	13	13	23	13	12	11	12	13	33		
55	12	13	12	12	23	11	12	23	11	33		
68	41	33	23	12	33	12	11	22	12	13		
1	22	33	13	12	33	12	11	13	12	23	H	ND
2	22	11	13	12	33	12	11	12	12	23	H	ND
3	12	33	33	22	33	11	11	13	11	33	H	ND
4	22	13	12	12	13	11	11	23	11	33	H	UC
5	22	13	12	22	33	11	11	12	13	22	H	ND
6	22	13	12	22	33	12	11	12	13	23	H	ND
7	22	33	33	23	33	11	11	23	11	23	H	ND
8	22	13	12	11	13	11	11	23	11	23	H	UC
9	22	11	12	12	33	11	11	12	12	23	H	ND
10	12	33	12	12	33	12	11	23	11	24	H	UC
11	12	33	33	11	13	12	11	23	11	24	H	ND
12	52	13	23	12	13	11	12	23	13	23	H	ND
13	22	33	12	12	13	11	11	22	11	34	H	UC
14	22	33	23	23	33	11	11	13	11	33	H	ND
15	12	13	12	11	33	12	11	23	11	34	H	UC
16	12	13	12	11	33	11	11	23	11	34	H	UC
17	22	13	13	11	33	11	11	12	13	33	H	ND
18	42	13	13	12	33	12	11	12	13	23	H	ND
19	32	33	13	22	33	12	11	13	13	23	H	ND
20	12	13	13	12	33	12	11	22	11	34	H	UC
21	22	11	12	12	33	12	11	13	13	23	H	ND
22	22	33	33	11	33	11	12	23	00	23	H	44
23	52	11	12	22	33	12	11	13	13	23	H	ND
24	22	33	12	11	13	11	11	22	11	23	H	ND
25	12	11	12	12	33	12	11	13	13	23	H	ND
26	22	33	12	12	33	12	11	12	13	23	H	ND
27	22	13	33	23	33	11	12	22	13	23	H	ND
28	22	13	13	11	13	11	11	22	11	33	H	UC
29	22	33	33	12	23	11	12	23	13	33	H	ND
30	22	13	12	11	23	11	11	23	11	23	H	55
31	12	13	23	22	33	11	11	22	13	33	H	ND
32	22	11	12	11	33	11	11	13	11	23	H	ND
33	22	13	22	22	33	11	11	22	13	34	H	ND
34	22	11	23	22	33	11	11	23	13	34	H	ND

35	62	11	12	22	33	11	11	12	13	22	H	52
36	22	33	33	22	33	11	11	23	13	23	H	ND
37	62	33	33	22	33	11	11	22	13	23	H	52
38	12	13	33	12	33	11	11	22	13	24	H	ND
39	22	13	23	12	33	11	11	22	13	00	H	30
40	12	33	22	11	33	11	12	00	13	33	H	ND
41	00	13	33	12	33	11	11	22	00	23		AF
42	42	33	33	11	33	11	11	23	13	23	H	ND
43	62	33	22	22	33	11	11	13	13	33	H	ND
44	12	33	23	12	33	11	11	23	13	33	H	ND

---

**Legenda:** ND (Não definido); AF (Autofecundação).