

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
CURSO DE ENGENHARIA AGRONÔMICA

JONAS ALVES MESQUITA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE BACURIZEIROS (*Platonia insignis* Mart.), POR
MEIO DO MARCADOR MOLECULAR ISSR DA BACIA HIDROGRÁFICA DO
MUNIM - MARANHÃO.**

São Luís/MA

2020

JONAS ALVES MESQUITA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE BACURIZEIROS (*Platonia insignis* Mart.), POR
MEIO DO MARCADOR MOLECULAR ISSR DA BACIA HIDROGRÁFICA DO
MUNIM - MARANHÃO.**

Monografia apresentada ao Curso de Agronomia Bacharelado do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. José de Ribamar Silva Barros

São Luís/MA

2020

Mesquita, Jonas Alves.

Caracterização genética de bacurizeiros (*Platonia insignis* Mart.) por meio do marcador molecular ISSR da Bacia Hidrográfica do Munim - Maranhão/ Jonas Alves Mesquita. – São Luís, 2020.

... f

Monografia (Graduação) – Curso de Engenharia Agrônômica, Universidade Estadual do Maranhão, 2020.

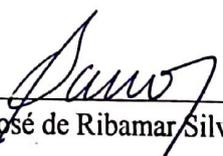
JONAS ALVES MESQUITA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE BACURIZEIROS (*Platonia insignis* Mart.), POR
MEIO DO MARCADOR MOLECULAR ISSR DA BACIA HIDROGRÁFICA DO
MUNIM - MARANHÃO.**

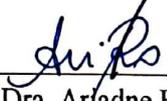
Monografia apresentada ao Curso de
Agronomia Bacharelado do Centro de
Ciências Agrárias da Universidade Estadual do
Maranhão, como requisito para obtenção do
título de Engenheiro Agrônomo.

Aprovada em: ___ / ___ / ___

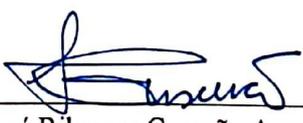
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José de Ribamar Silva Barros



Prof(a). Dra. Aríadne Enes Rocha



Prof. Dr. José Ribamar Gusmão Araujo

São Luís/MA

2020

Aos meus pais, que lutam constantemente por mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais que me deram a vida e me dão suporte até hoje, que fornecem o colo para repousar quando me sinto cansado. Aos meus queridos irmãos que me alegram nos momentos adversos e me incentivam a continuar buscando meus sonhos. A minha família sem a qual eu não estaria aqui.

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. José de Ribamar Silva Barros que me guiou até aqui, me incentivando pelo mundo da pesquisa em especial na área de genética, as oportunidades abertas, que não foram poucas, que permitiram o meu aperfeiçoamento no mundo acadêmico.

Aos meus amigos Luana Corrêa Silva e Phelipe Silva de Araujo, meus dois pilares dentro da graduação, pelas ajudas, conselhos, momentos de diversões e descontrações, mas, sobretudo ao companheirismo dado todo este tempo. Aos meus amigos Elayne Victória, Micael Araújo pelos bons momentos e conselhos. A Karina da Silva Vieira, que me suporta desde o ensino médio do Instituto Federal do Maranhão, Gustavo Freire e Abimael Matos.

Aos meus colegas de laboratório, Diego Marques, Gabriel Garcês, Gustavo Tinoco, Thailson, Laelson Rodrigues e Sérgio Lima que me forneceram apoio durante toda em parte da execução do meu trabalho. A Edyane Moraes dos Santos, minha mentora no Laboratório de Genética e Biologia Molecular Warwick Estervan Keer, pelo conhecimento dado sobre genética, e o incentivo a seguir na área.

Aos professores da graduação que se tornaram exemplo de vida, em especial a Prof(a). Dra. Ariadne Enes Rocha, com quem pude trabalhar no grupo de extensão de Produção Vegetal, participação que permitiu aprimorar minha visão sobre a forma de ver a produção alimentos.

A alegria não chega apenas no encontro do
achado, mas faz parte do processo da
busca. E ensinar e aprender não pode dar-
se fora da procura, fora da boniteza e da
alegria.

(Paulo Freire)

RESUMO

O bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.), planta nativa da Amazônia brasileira, está distribuída no estado do Maranhão nas regiões da Amazônia Maranhense, Baixada Maranhense e nos Cerrados do extremo sul e Baixo Parnaíba e ocorre em áreas de intensa atividade agrícola, onde desmatamentos e queimadas são comuns levando a uma rápida redução no número de indivíduos e diminuição da variabilidade genética. Estudos de natureza genético-molecular são escassos para a espécie, dificultando o reconhecimento da perda genética real. Logo o objetivo deste trabalho foi caracterizar geneticamente populações de bacurizeiros (*P. insignis* Mart.) existentes nos municípios de Chapadinha, Morros, Axixá, Santa Rita e Urbano Santos, pertencentes a Bacia Hidrográfica do Munim no estado do Maranhão, por meio dos marcadores moleculares ISSR. Foram realizados levantamentos da ocorrência de populações naturais e coleta de amostras nos municípios de Chapadinha, Urbano Santos, Morros, Axixá e Santa Rita. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular Warwick Estevan Kerr (LabWick) para processamento das etapas de extração e amplificação do DNA. O DNA foi extraído segundo o protocolo CTAB e as reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas com os primers ISSR UBC 808, 809, 810, 811, 825 e 840. Todos os primers utilizados amplificaram, o ISSR UBC 808 foi o que apresentou a menor quantidade de locus, $n = 3$, mas com 100% de polimorfismo. Os primers ISSR UBC 811 e 825 amplificaram a maior quantidade de locus, $n = 7$. A Análise de Variância Molecular (AMOVA) evidenciou baixa diversidade entre populações e alta dentro de populações, 11,41 % e 88,58 %, respectivamente. O índice de diversidade F_{st} foi de 0,17192, indicando moderada diferenciação genética entre populações. O índice de diversidade genética de Nei (H_e) foi de 0,435 (população de Morros) a 0,348 (população de Urbano Santos), mostrando índices médios altos de heterosigozidade. Porém observou-se processo de gargalo genético para os locus dos primers ISSR UBC 809 e 810, nas amostras de Urbano Santos e para os locus do primer ISSR UBC 810 no modelo de mutação por etapas (S.M.M.) para as amostras de Morros, indicando possível perda de alelos e decréscimo populacional no curto prazo. A análise de Coordenadas Principais (PCoA) revelou interação entre todas as amostras estudadas, indicando possível troca de genes entre os indivíduos da Bacia Hidrográfica do Munim e os agrupamentos formados no dendograma também mostram isso, contudo evidencia baixa correlação pelo índice utilizado no trabalho, $r = 0,6753$. Os resultados no geral apontam para medidas de conservação *in situ* desta espécie principalmente nas localidades onde observou-se processo de gargalo.

Palavras-chave: AMOVA; gargalo; agrupamentos.

ABSTRACT

The bakuri tree (*Platonia insignis* Mart.), a plant native to the Brazilian Amazon, is distributed in the state of Maranhão in the regions of Amazonia Maranhense, Baixada Maranhense and in the Cerrados of the extreme south and Baixo Parnaíba and occurs in areas of intense agricultural activity, where deforestation and fires are common, leading to a rapid reduction in the number of individuals and a decrease in genetic variability. Studies of a genetic-molecular nature are scarce for the species, making it difficult to recognize the real genetic loss. Soon the objective of this work was to genetically characterize populations of bacurizeiros (*P. insignis* Mart.) Existing in the municipalities of Chapadinha, Morros, Axixá, Santa Rita and Urbano Santos, belonging to the Munim Hydrographic Basin in the state of Maranhão, by means of molecular markers ISSR. Surveys were carried out on the occurrence of natural populations and sample collection in the municipalities of Chapadinha, Urbano Santos, Morros, Axixá and Santa Rita. The samples were sent to the Warwick Estevan Kerr Genetics and Molecular Biology Laboratory (LabWick) for processing the DNA extraction and amplification steps. The DNA was extracted according to the CTAB protocol and the polymerase chain reactions (PCR) were performed with the ISSR UBC 808, 809, 810, 811, 825 and 840 primers. All the primers used amplified, the ISSR UBC 808 was what presented the smallest amount of locus, $n = 3$, but with 100% polymorphism. The ISSR UBC 811 and 825 primers amplified the largest number of loci, $n = 7$. The Molecular Analysis of Variance (AMOVA) showed low diversity between populations and high within populations, 11.41% and 88.58%, respectively. The F_{st} diversity index was 0.17192, indicating moderate genetic differentiation between populations. The genetic diversity index of Nei (H_e) was 0.435 (Morros population) to 0.348 (Urbano Santos population), showing high average rates of heterosigosity. However, a genetic bottleneck process was observed for the ISSR UBC 809 and 810 primer loci in the Urbano Santos samples and for the ISSR UBC 810 primer locus in the step mutation model (SMM) for the Morros samples, indicating possible loss of alleles and population decrease in the short term. The analysis of Principal Coordinates (PCoA) revealed interaction between all studied samples, indicating a possible exchange of genes between individuals in the Munim Basin and the clusters formed in the dendrogram also show this, however it shows low correlation by the index used in the work, $r = 0.6753$. The results in general point to measures of conservation in situ of this species mainly in the localities where bottleneck process was observed.

Keywords: AMOVA; neck; groupings.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Bacurizeiro, árvore jovem (A), folha (B), flor (C), espécie de traupídeo (D), espécie de psitacídeo (E) e detalhe do fruto (F).18
- Figura 2.** Fruto de bacuri evidenciando as sementes envoltas pela polpa e frutos colhidos variando em tamanho e coloração.19
- Figura 3.** Mapa com localização da Bacia Hidrográfica do Munim, com destaque para os municípios estudados no presente trabalho.23
- Figura 4.** Produtos da amplificação do primer ISSR UBC 809 (A) e o primer ISSR UBC 810 (B) para as amostras MR 1 a MR 15 e AX 1 a AX 11.28
- Figura 5.** Diagrama bidimensional da primeira e segunda coordenadas (eixo), análise de coordenadas principais (PCoA) para *P. insignis*.31
- Figura 6.** Análise de agrupamento das 71 amostras de *P. insignis* com base nos seis marcadores ISSR, utilizando o método UPGMA/Jaccard.32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers ISSR utilizados, temperatura de anelamento e sequência de bases.....	25
Tabela 2. Identificação dos primers, número de locus amplificados e taxas de polimorfismos.	27
Tabela 3. Análise da variância molecular (AMOVA) da estrutura genética de <i>P. insignis</i> entre e dentro de populações, genotipadas com marcadores ISSR.....	28
Tabela 4. Índices de diversidade de Nei (H_e) e testes de equilíbrio entre mutação e deriva genética para as populações de <i>P. insignis</i> sobre os modelos I.A.M. e S.M.M.....	30

LISTA DE SIGLAS

AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism

AMOVA – Análise de Variância Molecular

AX – Axixá

CH – Chapadinha

CIA – Clorofórmio álcool isoamílico

CTAB – Brometo de Cetil Trimetilamonio

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

FAMD – Fingerprint Analysis with Missing Data

I.A.M. – Modelo de alelos infinitos

ISSR – Inter Simple Sequence Repeats Amplification

MR – Morros

PCR – Reação em cadeia da Polimerase

PCoA – Análise de Coordenadas Principais

RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA

S.M.M. – Modelo de mutação por etapas

SSR – Simple Sequence Repeats

SR – Santa Rita

TE – Tris EDTA

UB – Urbano Santos

UBC – University of British Columbia

UPGMA - Método do Grupo de Pareamento não Ponderado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. Taxonomia.....	16
2.2. Distribuição Geográfica.....	16
2.3. Características da planta, flor e fruto	17
2.4. Variabilidade Genética e marcadores moleculares	21
3. METODOLOGIA.....	24
3.1. Área de trabalho e coletas.....	24
3.2. Extração de DNA, e amplificação dos locus ISSR.	25
3.3. Análises estatísticas	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.2. Análise da diversidade genética	28
5.2. Análise de Agrupamento	32
5. CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

O bacuri - “ba”- cair e “curi”- logo – “coletado no chão” (*Platonia insignis* Mart.), divisão *Magnoliophyta*, Classe *Magnoliopsida*, Ordem *Malpighiales* e Família *Clusiaceae* é considerada a única espécie do gênero *Platonia* (CAVALCANTE, 1996). É uma espécie nativa da Amazônia brasileira e possui centro de origem no estado do Pará, onde estão estabelecidas densas e diversificadas populações naturais. É também encontrado, espontaneamente, nos outros estados da Amazônia brasileira, no Piauí e Maranhão (CARVALHO, 2007). No estado do Maranhão, a espécie está distribuída nas regiões da Amazônia Maranhense, Baixada Maranhense e nos Cerrados do extremo sul e Baixo Parnaíba (NASCIMENTO et al., 2007).

Ocorre em matas de terra firme e de vegetação aberta de transição, em áreas descampadas ou de vegetação baixa, sendo rara sua ocorrência em florestas primárias densas (CAVALCANTE, 1996). Desenvolve-se em regiões de clima úmido e semi-úmido e, também em regiões de cerrado e cerradão. Passou da utilização apenas do fruto para uma árvore de interesse madeireiro. O bacuri é uma das frutas mais populares da região amazônica. Contém polpa agridoce rica em potássio, fósforo e cálcio, que é consumida diretamente ou utilizada na produção de doces, sorvetes, sucos, geleias, licores e outras iguarias (HOMMA et al., 2010; ALVAREZ e POTIGUARA, 2013).

Existem poucos estudos moleculares e genéticos do Bacuri. A maioria dos estudos se referem à repetibilidade e relações fenotípicas (SILVA et al., 2009), bancos de germoplasma (GUIMARÃES, et al., 1992), composição e características do fruto (CARVALHO, 2003; CAVALCANTE et al., 2019; SANTOS et al., 2019), métodos de propagação (CARVALHO & NASCIMENTO, 2018), e aspectos ecológicos (SOUSA et al., 2000), entre outros trabalhos. Entre os estudos moleculares, destacam-se os trabalhos com marcadores ISSR de Souza et al. (2013), e Pontes et al. (2017), no Nordeste e Norte do Brasil, respectivamente.

O ISSR, “Inter Simple Sequence Repeat Amplification”, se destaca devido ao elevado grau de polimorfismo, reprodutibilidade e baixo custo (SALIMATH et al. 1995). O marcador molecular ISSR tem se mostrado uma poderosa ferramenta para análise da diversidade genética, bem como para a caracterização de diversas espécies. Por se tratar de um marcador multiloco que não requer conhecimento prévio do DNA a ser avaliado, o ISSR é uma técnica de baixo custo, de fácil uso e de grande reprodutibilidade.

No Maranhão, o bacurizeiro ocorre em áreas de intensa atividade agrícola, onde desmatamentos e queimadas são comuns e, como consequência, uma rápida redução no número de plantas existentes tem ocorrido e, por conseguinte, a diminuição da variabilidade genética

(CARVALHO, et al., 2009). O surgimento de variedades adaptadas às condições de clima e solos do cerrado e os incentivos fiscais direcionados aos produtos de exportação, commodities, como a soja e a cana, potencializam o processo migratório de ocupação das áreas, com agressão ao meio ambiente e às comunidades tradicionais.

Tal perturbação pode acarretar uma fragmentação das populações levando-as a uma limitação evolutiva. Estudos que comparam a estrutura genética populacional de espécies vegetais e graus de perturbação da paisagem são fundamentais para reconhecimento da perda genética real, fornecendo diretrizes para o uso racional dos recursos naturais e para que estratégias de conservação sejam propostas, garantindo a sobrevivência das espécies.

Logo o objetivo deste trabalho foi caracterizar geneticamente populações de bacurizeiros (*P. insignis* Mart.) existentes nos municípios de Chapadinha, Morros, Axixá, Santa Rita e Urbano Santos, pertencentes a Bacia Hidrográfica do Munim no estado do Maranhão, por meio dos marcadores moleculares ISSR.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Taxonomia

O bacurizeiro pertence à família *Clusiaceae*, subfamília *Clusioideae* e ao gênero *Platonia*, que é monotipo, única espécie pertencente ao gênero. A família botânica *Clusiaceae* engloba aproximadamente 1000 espécies subordinadas a 47 gêneros, dispersos em regiões tropicais e subtropicais do mundo (BARROSO et al., 2002), e um gênero que alcança as regiões temperadas. Em nove desses gêneros, cerca de 90 espécies são de plantas cujos frutos são comestíveis (YAACOB & TINDALL, 1995).

No Brasil, essa família está representada por cerca de 20 gêneros e 183 espécies, distribuídas nas diferentes regiões do País (BARROSO, 2002). Na Amazônia, a família é representada por aproximados 17 gêneros e número de espécies superior a 50. Entre as espécies frutíferas nativas da Amazônia Brasileira, são encontrados cinco representantes dessa família, sendo a mais importante, do ponto de vista econômico, o bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). As outras pertencem ao gênero *Garcinia* e são conhecidas como bacuri-mirim (*G. gardneriana* Miers. ex. Pl. et.Tr.), bacuripari liso (*G. brasiliensis* Mart.), bacurizinho (*G. acuminata*) e bacuripari (*G. macrophylla* Mart.), todas de porte e frutos bem menores, e de qualidade inferior, que o bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.).

O bacurizeiro foi primeiramente descrito pelo botânico brasileiro Manuel Arruda da Câmara, em 1816, que o enquadrou no táxon genérico *Moronobea* e o denominou de *Moronobea esculenta* Arruda da Câmara. Em 1832, o botânico alemão Karl Friedrich Phillip von Martius, reconhecendo a impropriedade da inclusão do bacurizeiro no gênero *Moronobea*, criou o gênero *Platonia* e o denominou de *Platonia insignis* Mart.

2.2. Distribuição Geográfica

Alguns autores colocam o centro de origem da espécie como o estado do Pará, mas trabalhos como o de Almeida (2004), sugerem o estado do Maranhão como seu centro de origem, vide a grande variabilidade genética e morfológica da espécie. Mas a maioria sugere que do estado do Pará, o bacurizeiro se dispersou em direção ao Nordeste do Brasil, estando muito presente na Amazônia Maranhense, mas também nos cerrados e os chapadões dos estados do Maranhão e do Piauí, onde forma povoamentos densos em áreas de vegetação secundária. Na direção sul, a dispersão atingiu os estados do Tocantins e do Mato Grosso, chegando a romper as fronteiras do Brasil ao atingir o Paraguai (CAVALCANTE, 1996). Na distribuição

geográfica do bacurizeiro, proposta por Cavalcante (1996), alguns pontos merecem consideração especial, como a presença da espécie no Paraguai e a não consideração de áreas em locais em que não é encontrado em estado nativo.

A dispersão natural, na Amazônia brasileira, atingiu os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Roraima e Tocantins. Nos quatro primeiros estados, a ocorrência é sempre em áreas de floresta primária e com reduzido número de indivíduos por hectare, enquanto no estado do Tocantins é encontrado tanto em áreas de floresta primária como de floresta secundária. Conquanto não haja registros de ocorrência da espécie em Rondônia, é provável que a dispersão também tenha atingido esse estado, pois não existem barreiras físicas, climáticas e edáficas que impossibilitem a presença da espécie na localidade. Além disso, Rondônia limita-se ao norte com o estado do Amazonas, ao leste com o Mato Grosso e ao oeste e ao sul com a Bolívia, locais em que a espécie já foi assinalada em estado espontâneo (CAVALCANTE, 1996).

Na direção da Região Nordeste do Brasil, a dispersão alcançou os estados do Maranhão e do Piauí. No primeiro estado, ocorre em áreas limítrofes com o Tocantins e o Pará, acompanhando, respectivamente, os cursos dos rios Tocantins e Gurupi. É abundante no município de Carutapera, onde, em algumas áreas, é possível encontrar número superior a 200 indivíduos adultos por hectare (CAVALCANTE, 1996).

Também é encontrado em São Luís do Maranhão e na região mais ao leste do estado, sobretudo nos municípios Mirador, Matões, Timon, Caxias, Aldeias Altas e Coelho Neto, entre outros (SOUZA, 2011). Ainda no estado do Maranhão Loch e Muniz (2016), citam a espécie *Platonia insignis* junto com *Parkia platycephala* e *Curatella americana* como elementos típicos da paisagem do cerrado, devido sua adaptabilidade a este ecossistema.

2.3. Características da planta, flor e fruto

As árvores de bacurizeiro são de grande porte cuja altura pode variar de 15 a 25 m, e em alguns indivíduos ultrapassar os 30 m, com 1,5 m de diâmetro (CARVALHO & NASCIMENTO, 2018). É perenifólia, heliófila e seletiva higrófila, características apresentadas de plantas de vegetação aberta de transição em áreas descampadas. A planta possui tronco reto, casca espessa que quando cortada exsuda um látex amarelo e resinoso. A copa tem formato variado, mas a forma mais comum é a de um cone invertida (CARVALHO & NASCIMENTO, 2018).

Os ramos crescem orientados numa posição entre 50° e 60° em relação ao tronco (CAVALCANTE, 1996). Possui folhas simples e opostas, pecioladas, de textura

subcoriácea a coriácea, de formato obovada, ovada, elíptica ou elíptico obovada, lâmina foliar simétrica, medindo de 15 a 20 cm de comprimento e 6 a 9 cm de largura, glabras e verde-brilhosas na face superior (Figura 1). Alvarez e Potiguara (2013), verificaram caracteres anatômicos xeromórficos nas folhas de *P. insignis* como: folhas bastante espessadas, camada de cera epicuticular compacta, presença de hipoderme, estômatos pequenos e em grande quantidade presentes nas duas superfícies, presença de cristais e tecido esclerenquimático desenvolvido.

As flores são hermafroditas e andróginas, actinomorfas, grandes com 7 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro, e terminais, apresentando 5 sépalas e de 4 a 6 pétalas de coloração branco-rosé a amarelo, cobrindo toda a copa, com um belo efeito ornamental (CLEMENT & VENTURIERI, 1990). A espécie apresenta alogamia acentuada e autoincompatibilidade esporofítica (característica dominante), quando as flores são autopolinizadas não há crescimento do tubo polínico (SOUZA, 2018).

As flores abrem-se durante o dia e assim atraem grande variedade de visitantes que procuram néctar e pólen, produzidos em abundância. A polinização é ornitófila (Figura 1), pois os grãos de pólen se localizam em um aglomerado viscoso que impossibilita a sua dispersão pelo vento (SOUZA, 2018). No estado do Maranhão, 22 espécies de aves foram registradas visitando as flores do bacurizeiro, e destas, 74% foram de traupídeos, 12% de psitacídeos e as espécies mais abundantes foram: *Traupis palmarum* (38%), *Nemosia pileata* (20%), *Diopsittaca nobilis* (9%) e *Coereba flaveola* (8%) (AZAMBUJA, 2008).

O gineceu é pluricarpelar e o fruto do bacurizeiro origina-se de um ovário plurilocular (BATISTA, 2006). É uma baga volumosa de formato ovóide a arredondado ou subglobosa, de tamanho variável, com diâmetro variando de 7 a 12 cm e peso médio entre 350 e 400 g, porém podendo alcançar até 1.000 g (MORAES et al., 1994) (Figura 2).

Figura 1. Bacurizeiro. (A) Árvore jovem; (B) Folha; (C) Flor, e (F) detalhe do fruto. Visitantes florais do bacurizeiro: (D) espécie de traupídeo, e (E) espécie de psitacídeo.



Fonte: SOUZA, I. G. B. (2011).

Na região Meio-Norte têm sido encontradas plantas cujo peso médio dos frutos atingem até 700 g (SOUZA et al., 2005). Apresenta casca com 1 a 2 cm de espessura, de coloração variando do verde ao amarelo-citrino, lisa e lustrosa, rígido-coriácea, quebradiça, carnosa e resinosa. De acordo com Teixeira et al. (2005), o bacuri é um fruto não-climatérico, ou seja, só amadurece enquanto estiver ligado à planta. Após a colheita, os frutos não melhoram suas características sensoriais e nutricionais, embora um leve amolecimento e perda da coloração verde possam ocorrer.

A maioria dos frutos possui duas a três formações partenocárpicas de polpa mais espessa, com uma minúscula semente central, popularmente denominada de “filhos”, na Amazônia, e “línguas”, na região Meio-Norte (Figura 2). A polpa é macia, fibromucilagínosa, de coloração branca a branco-amarelada, fortemente aderida à semente.

Figura 2. Fruto de bacuri evidenciando as sementes envoltas pela polpa e frutos colhidos variando em tamanho e coloração.



Fonte: FERREIRA, S. (2008)

As sementes do bacuri são grandes e superpostas de formato oblongo-anguloso ou elipsóide. São oleaginosas, ligeiramente côncavas na parte correspondente à linha da rafe e convexa no lado oposto (SOUZA, 2018). De acordo com Vilhachica et al., (1996), o óleo extraído das sementes possui alta porcentagem de ácido palmítico e oléico. É uma planta de alta versatilidade fenotípica, desenvolvendo-se bem em regiões de clima úmido e subúmido, e também, em regiões de Cerrado e Cerradão. Tem se mostrado indiferente ao tipo de solo, apresentando bom desenvolvimento em solos pobres e ácidos com textura que varia de arenosa até argilosa, desde que sejam permeáveis e profundos (CARVALHO & NASCIMENTO, 2018).

O bacurizeiro tem sido citado como espécie promissora, pelas amplas possibilidades que apresenta como espécie de uso múltiplo. De acordo com o censo agrícola de 2017 (IBGE, 2018), o estado do Maranhão é o segundo no Brasil que mais contribui para a produção de frutos de *P. insignis*. Devido ao sabor e aroma peculiares, o fruto de bacuri é bastante utilizado na elaboração de sucos, sorvetes, cremes, doces, compotas, sendo também consumido in natura pelas populações da Amazônia e de parte do Nordeste do Brasil, particularmente nos estados do Maranhão e Piauí, onde a espécie tem ocorrência natural (CARVALHO & NASCIMENTO, 2018).

Como fruta in natura, é comercializada, principalmente, nas Centrais de Abastecimento de Belém (PA), São Luís (MA) e Teresina (PI), apresentando produção

insuficiente para atender à demanda do mercado consumidor destas capitais. No médio ou longo prazo essa espécie pode se estabelecer como uma excelente alternativa para os mercados interno e externo de frutas (SOUZA et al., 2000).

O fruto de bacuri tem grande importância para as populações rurais onde a espécie ocorre, pois o utilizam para alimentação, propiciando o suprimento de nutrientes de maneira saborosa e como fonte de renda, pois a comercialização deste produto é garantida (SHANLEY & MEDINA, 2005).

De acordo com o trabalho de Santos et al., (2019), estudando características biométricas e químicas de frutos de *P. insignis*, oriundas de seleções nativas do estado do Maranhão, encontraram massa dos frutos variando de $266,48 \pm 23,20$ a $379,18 \pm 18,68$ g, com rendimento de polpa de médias de $19,98 \pm 0,76$, $18,33 \pm 1,65$, $18,05 \pm 0,81$ e $17,07 \pm 1,43\%$, para as seleções ‘Marcos’, ‘Mamão’, ‘Prata’ e ‘Domingão’, respectivamente, o que ainda indica baixo rendimento de polpa. O mesmo trabalho ainda encontrou teor de sólidos solúveis totais variando de $16,30 \pm 0,58$ e $19,47 \pm 0,06$ °Brix e acidez de $0,48 \pm 0,01$ a $1,33 \pm 0,03\%$ de ácido cítrico. Rufino et al. (2010), avaliando frutos provenientes de Coelho Neto (Maranhão) quanto a quantidade de vitamina C em 100 g de polpa fresca, encontraram o valor de 2,4 mg da vitamina. Becker et al. (2018), analisando varias frutas de origem Amazônica, encontrou 13,58, 7,03, 7,01, 0,16, 0,20, 0,02, 0,64 mg.g⁻¹, dos minerais sódio, cálcio, magnésio, cobre, ferro, manganês e zinco, respectivamente para frutos de *P. insignis*. O trabalho ainda destacou para a atividade antioxidante dos frutos de *P. insignis*.

O bacurizeiro também se caracteriza como espécie madeireira, produzindo madeira de lei compacta e resistente, de alta qualidade ($0,80-0,85$ g/cm³ de densidade) e de boas propriedades físico-mecânicas. Apresenta cerne de coloração bege-rosado e alborno bege-claro. A madeira é excelente para uso em obras hidráulicas, na construção naval, construção civil e, também, na fabricação de alguns tipos de móveis domésticos ou industriais. Segundo Vasconcellos et al. (2001) a madeira possui alta resistência ao ataque de fungos saprófitas e moderada resistência ao ataque de cupins, além de possuir a característica de pouca permeabilidade a soluções preservantes hidrossolúveis.

2.4. Variabilidade Genética e marcadores moleculares

Até o início da década de 80, a espécie *P. insignis* era apresentada com riscos mínimos de erosão genética, já que tem a característica de emitir abundantes brotações de raízes, mesmo

após a derrubada da planta mãe (CARVALHO & NASCIMENTO, 2018). Entretanto, já no final da década de 80 e início da década de 90, a utilização do bacurizeiro com finalidade madeireira começou a colocar em risco seu patrimônio genético. Além disso, a atividade da pecuária tem impedido a regeneração natural das plantas, tanto pelo pisoteio quanto pelo pastejo do gado das brotações oriundas de raízes. Sabe-se também que as brotações são clones da planta mãe, logo não há formação de frutos. Outras características como longo tempo para germinação e elevada juvenilidade também podem prejudicar a espécie assim sua exploração comercial (CARVALHO & NASCIMENTO, 2018).

A expansão da área urbana de cidades situadas nas regiões litorâneas dos estados do Maranhão e Pará também contribui para o comprometimento da variabilidade genética do bacurizeiro. Por isso, é necessário que se intensifiquem os trabalhos de pesquisa concernentes à coleta, conservação *ex situ*, avaliação e caracterização de germoplasma, métodos de propagação, sistemas reprodutivos e técnicas de cultivo para resguardar o seu patrimônio genético e para subsidiar programas de melhoramento que levem a sua completa domesticação.

O bacurizeiro, como uma espécie alógama necessita do movimento de genes, via pólen e/ou sementes, para assim manter uma boa estrutura genética de suas populações. Portanto, para que os fragmentos de vegetações naturais não sejam comprometidos, em espécies alógamas, é necessário que haja troca de genes entre tais fragmentos. Se isto não ocorrer, as populações podem entrar em depressão por endogamia, o que resultará na perda de vigor das gerações seguintes, comprometendo a existência da espécie naquela localidade. Isto foi demonstrado no trabalho de Santos et al., (2017), onde constataram, mesmo em moderada diversidade genética do bacuri na Reserva Extrativista da Chapada Limpa, que a espécie sofreu consequências diretas dos intensos eventos de incêndios florestais e/ou da redução da vegetação primária.

A caracterização dos recursos genéticos de plantas cultivadas tem sido tipicamente baseada em observações de longo prazo de atributos agronômicos e morfológicos, mas rápida e técnicas moleculares poderosas estão agora amplamente disponíveis. O uso de marcadores de DNA na triagem de germoplasma, por exemplo, tornou-se universal, pois permite a discriminação de plantas morfológicamente indistinguíveis (TANTASAWAT et al., 2010), além de auxiliar em trabalhos de propagações *in vitro* e no melhoramento genético (THAKUR et al., 2016).

Dentre os marcadores moleculares, os ISSR são largamente utilizados na estimação da diversidade e estruturação de populações intraespecíficas, assim como na caracterização e avaliação de bancos de germoplasma (CHRISTOPOULOS et al., 2010; DJE et al., 2010). Os ISSR são associados ao uso de sequências microssatélites (sequências simples repetidas – SSR,

organizadas em sequência, com 2 a 4 bases) (GUPTA et al., 1994), distribuídas abundantemente no genoma de organismos eucariotos (LIU & WENDEL, 2001). A técnica consiste na amplificação de determinado trecho do genoma via reação em cadeia da polimerase (PCR), que abrange dois microssatélites idênticos, adjacentes e orientados de forma inversa.

O ISSR consiste em uma técnica rápida e de fácil manuseio, que supera limitações de muitos outros marcadores moleculares, pois combina as vantagens do SSR do polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), com a universalidade do RAPD. A longa sequência e as temperaturas de anelamento elevadas dos primers ISSR não só especifica o alvo a ser amplificado, como também melhora a confiabilidade e reprodutibilidade (BORNET & BRANCHARD, 2001).

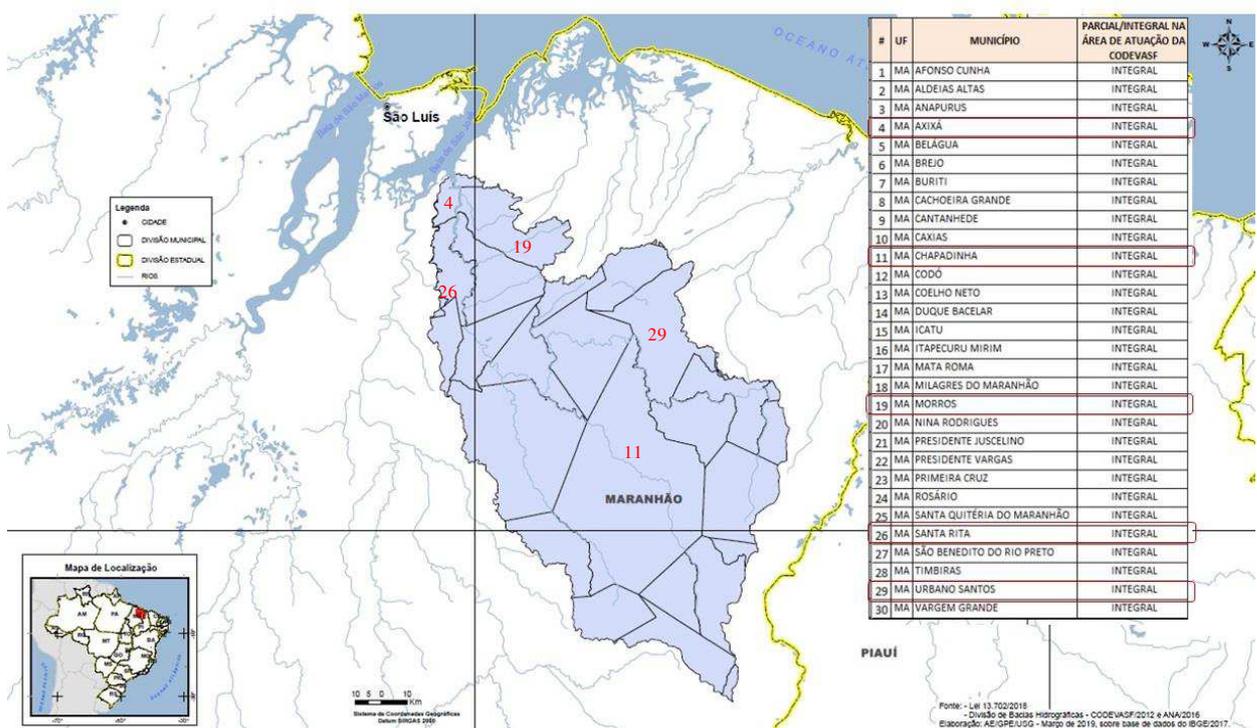
O marcador ISSR permite avaliar a estrutura genética de populações e averiguar se algum processo de perda de variabilidade está ocorrendo, como já foi demonstrado nos trabalhos de Santos et al. (2017), Pontes et al. (2017) e Souza et al. (2013).

3. METODOLOGIA

3.1. Área de trabalho e coletas

Foram realizados levantamentos da ocorrência de populações naturais de bacuri nos municípios de Chapadinha, na Resex da Chapada Limpa (3° 56' 25" Sul, 43° 30' 53" Oeste), Urbano Santos (3° 12' 30" Sul, 43° 24' 16" Oeste), Morros (9° 27' 1" Sul, 46° 17' 53" Oeste), Axixá (2° 50' 42" Sul, 44° 3' 39" Oeste) e Santa Rita (3° 8' 49" Sul, 44° 19' 11" Oeste), pertencentes a Bacia Hidrográfica do Munim. Arelado às coletas de material biológico, as áreas de ocorrência da espécie foram georreferenciadas por GPS Garmim Etrex. Na imagem abaixo está demonstrada a Bacia Hidrográfica do Munim com todos os seus municípios.

Figura 3. Mapa com localização da Bacia Hidrográfica do Munim, com destaque para os municípios estudados no presente trabalho.



Fonte: CODEVASF/2012 e ANA/2016; Elaboração: AE/GPE/USG (2019); Modificado: MESQUITA (2020).

A Bacia Hidrográfica do rio Munim localiza-se na porção extremo-leste do Maranhão com área de 15.918,04 km², equivalente a 4,79% do estado. O rio Munim, curso principal da bacia, deságua na baía de São José, entre os municípios de Axixá e Icatu. Possui 331,74 km de extensão, suas nascentes estão situadas nos Tabuleiros da Formação Barreiras, a Nordeste do

município de Caxias, tendo como principais afluentes a margem esquerda os rios Iguará, Paulica, riacho Mocambo, Raiz, da Cruz e São Gonçalo pela margem direita, os rios Preto, riacho Pirangi, Una e da Mata.

De cada localidade foram coletadas amostras de tecido foliar de 15 indivíduos de *P. insignis*, com exceção de Axixá onde foram coletados apenas 11, totalizando 71 amostras. Foi tomada uma distância mínima de 15 m entre plantas para evitar a coleta de clones. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular Warwick Estevan Kerr (LabWick) para processamento das etapas de extração e amplificação do DNA.

3.2. Extração de DNA, e amplificação dos locus ISSR.

A extração do DNA genômico foi realizada com base no protocolo CTAB de Doyle e Doyle (1987), processada da seguinte forma: a) adicionou-se no tubo, já contendo o tecido foliar (1 g) 700 µl de tampão de extração CTAB 2%, em seguida encubou-se no banho-maria a uma temperatura de 65°C por um mínimo de 30 minutos; b) logo após, adicionou-se 600µl de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1); c) posteriormente realizou-se a primeira centrifugação a uma velocidade máxima (14000 rpm) durante 5 minutos, para que a fase aquosa e orgânica fossem separadas; d) a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionado 50 µl de CTAB 10%, e depois, mais 600 µl de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1); e) prosseguiu-se então a segunda centrifugação a uma velocidade máxima de 12000 rpm durante 5 minutos; f) novamente com a fase aquosa na parte superior, transferiu-se cuidadosamente para um novo tubo adicionando 500 µl de álcool isopropanol e colocados no freezer -20°C por duas horas; g) logo após foi realizada a centrifugação dos tubos a 7500 rpm durante 5 minutos para formar o pellet; h) depois descartou-se o álcool e o pellet foi lavado com álcool três vezes, e em cada intervalo, realizou-se a centrifugação e depois o descarte do álcool, o deixando secar sob o papel toalha; i) em seguida foi colocado na estufa para evaporar todo álcool; j) por último ressuspendeu-se o pellet com 50 µl de TE e levados ao freezer para conservação do material.

Após a extração de DNA e corrida em eletroforese, o material genético foi quantificado e determinado sua pureza no aparelho BioDrop antes de ser submetido à técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para a amplificação da região específica a ser investigada. Foram selecionados 6 primers do marcador ISSR, como mostra a tabela 1.

Tabela 1. Primers ISSR utilizados, temperatura de anelamento e sequência de bases.

Primers	Temperatura de Anelamento °C	Sequência 5'-3'
UBC 808	48	(AG)8C
UBC 809	48	(AG)8G
UBC 810	48	(GA)8T
UBC 811	48	(GA)8C
UBC 825	48	(AC)7A
UBC 840	48	(GA)8YT

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 13 μ L, de acordo com o protocolo de Viana et al., (2019), contendo os seguintes componentes: tampão de PCR 1,3 μ L (1X); 1,5 μ L de dNTPs a 10mM; 1,0 μ L de cloreto de magnésio a 25 mM; 1,0 μ L do primer; 0,12 μ L de Taq DNA polimerase a 5 U; 10 ng de DNA; e completados com 6,08 μ L de água MiliQ. As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems), programada da seguinte forma: 95°C por 10 minutos, 35 ciclos [1 minuto a 95°C; 1 minuto a 48°C e 2 minutos a 72°C] e a extensão a 72°C por sete minutos. Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% por 1 hora e 30 minutos corados com Diamond Nucleic Acid Dye da Promega. Em seguida, foram visualizados em transiluminador UV e fotodocumentados.

3.3. Análises estatísticas

Os produtos amplificados foram designados como um único caractere, onde sua presença foi representada por “1” e ausência por “0”. Os marcadores ISSR foram convertidos em uma matriz binominal (0/1). A relação genética entre os genótipos foi estimada pelo coeficiente de Jaccard, que resultou em uma matriz de similaridade. A concordância entre a matriz de similaridade e o dendrograma foi estimada pelo coeficiente de correlação cofenético (r), segundo Sokal e Rohlf (1962). O dendrograma foi encontrado através do Método do Grupo de Pareamento não Ponderado usando médias aritméticas (UPGMA) para ilustrar a relação entre as duas populações coletadas. Foi realizada também a análise de coordenadas principais (PCoA) para mostrar a relação entre as amostras. Estas análises foram processadas no software PAST, versão 1.34 (HAMMER et al., 2001).

A estrutura genética da população (heterozigosidade - H_e), bem como os valores de diferenciação genética de uma única população ou entre populações (índice de fixação- F_{st}) foram analisados no software Arlequin 3.11 (EXCOFFIER et al., 2005). O teste de gargalo

genético foi executado no software Bottleneck 1.2 (CORNUET e LUIKART, 1997), para verificar se houve redução recente ou efetiva das populações através dos modelos de alelos infinitos (I.A.M.) e modelo de mutação por etapas (S.M.M.). O índice de Shannon, analisado por meio do programa Fingerprint Analysis with Missing Data 1.31 (FAMD), foi calculado para medir a diversidade da espécie na área. A análise de variância molecular (AMOVA) também foi usada para mostrar a distribuição da diversidade genética dentro e entre as populações, sendo criados dois níveis hierárquicos, diversidade entre cada uma das cinco populações e diversidade dentro das populações. A AMOVA foi realizada de acordo com Excoffier et al. (1992), com o auxílio do software Arlequin.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2. Análise da diversidade genética

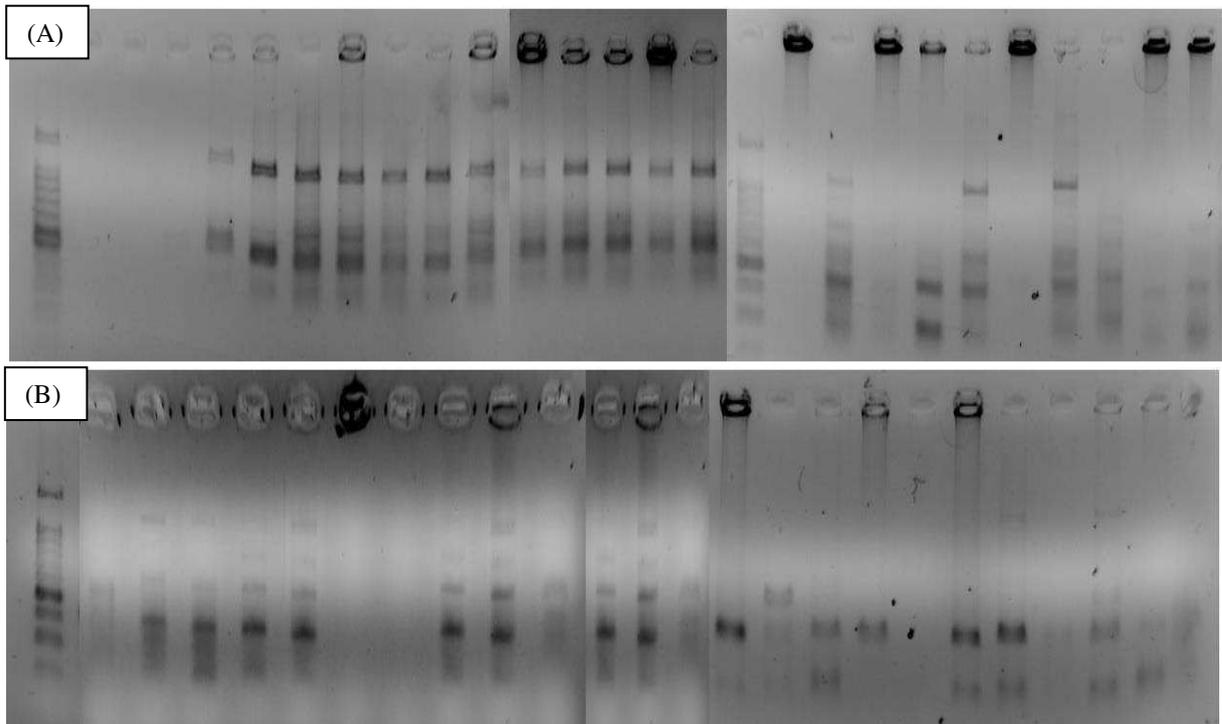
Dos seis primers de ISSR previamente selecionados e testados todos foram amplificados. Como mostra a tabela abaixo o primer ISSR UBC 808 foi o que amplificou a menor quantidade de locus, (n=3), mas que apresentou todos os locus polimórficos, diferindo levemente dos achados de Pontes et al., (2017), que encontrou quatro locus para o primer, trabalhando com bacurizeiros na ilha de Marajó no Pará. O total de locus amplificados e analisados foi 31, com taxa de polimorfismo média de 70,96%. Souza et al., (2013), encontrou 236 locus ao analisar bacurizeiros no Maranhão e Piauí, com taxa de polimorfismo de 93,64% destes locus. Mesmo a autora tendo utilizado uma quantidade maior de primers, alguns primers comuns no trabalho como o UBC 810, a quantidade de locus amplificada e taxa de polimorfismo é maior, o que pode indicar perda de alelos nas populações da Bacia Hidrográfica do Munim.

Tabela 2. Identificação dos primers, número de locus amplificados e taxas de polimorfismos.

Primer	Sequência	Total de Locus	Locus Polimorf.	% de Polimorf.
UBC 808	(AG)8C	3	3	100
UBC 809	(AG)8G	5	3	60
UBC 810	(GA)8T	5	5	100
UBC 811	(GA)8C	7	4	57,14
UBC 825	(AC)7A	7	5	71,42
UBC 840	(GA)8YT	4	2	50
TOTAL	-	31	22	70,96

Como mostra a tabela acima os primers que amplificaram a maior quantidade de locus foram o ISSR UBC 811 e 825, ambos com 7 locus amplificados, mas que apresentaram 57,14% e 71,42% de polimorfismo. O polimorfismo é um parâmetro frequentemente utilizado para estimar a eficiência dos marcadores na avaliação da diversidade genética (GRAVITOL, 2011). O polimorfismo genético é a variação genética na sequência de alelos, na sequência de bases nucleotídicas ou na estrutura cromossômica. No gel de agarose esse polimorfismo pode ser observado pela diferença no padrão das bandas (Figura 4).

Figura 4. Produtos da amplificação do primer ISSR UBC 809 (A) e o primer ISSR UBC 810 (B) para as amostras MR 1 a MR 15 e AX 1 a AX 11.



Fonte: Elaboração própria, (2019).

Os resultados da AMOVA (Tabela 4) da estrutura genética da população mostraram alta diversidade genética dentro das populações (88,58%) e baixa diversidade entre as populações (11,41%) e F_{st} de 0,114. Quando comparados com os dados de Pontes et al. (2017) o F_{st} foi 0,064 e variação de 6% entre progênies e 94% dentro das progênies em bacurizeiros da ilha de Marajó no Pará. Já o trabalho realizado por Santos et al., (2017), com *P. insignis* na Resex de Chapadinha apresentou 14,77% de diferenciação entre grupos e 85,22% dentro de grupos, com índice de diferenciação genética, F_{st} , de 0,17192, próximos aos achados no trabalho.

Tabela 3. Análise da variância molecular (AMOVA) da estrutura genética de *P. insignis* entre e dentro de populações, genotipadas com marcadores ISSR.

Fonte de Variação	Soma de quadrados	Componente de Variação	% de Variação
Entre Populações	66,646	0,80609	11,416
Dentro de Populações	396,326	625,513	88,584
Total	462,972	706,122	100
F_{st}	0,11416	-	-

As variações genéticas medidas pela estatística F, descrita pela teoria de Sewall Wright nas décadas de 40 e 50, que introduziu os parâmetros Fst, Fit e Fis, fornecem de maneira sumarizada a estrutura da população estudada (ARAÚJO, 2004; MENEZES, 2005). O Fst é o índice de fixação ou coeficiente de consanguinidade entre subpopulações, onde seu valor é utilizado para medir a distância entre subpopulações, assumindo valores entre zero e um e, quanto maior for esse valor, maior será a diferenciação entre as subpopulações estudadas. Wright (1978), sugeriu os seguintes valores na diretriz de interpretação do Fst: de 0 a 0,05, pouca diferenciação genética; de 0,05 a 0,15, diferenciação genética moderada; de 0,15 a 0,25, grande diferenciação genética; e valores acima de 0,25 significam alta diferenciação genética. Logo na classificação de Wright (1978), os dados para os bacurizeiros nas localidades analisadas mostram moderada diferenciação genética.

Com relação ao índice de diversidade genética de Nei (He), a variação foi de 0,435 a 0,348 (média - 0,445) para as populações de Morros e Urbano Santos, respectivamente (Tabela 4). Em muitos locus foi possível observar o valor máximo considerados para o índice de diversidade de Nei, He igual a 0,533. Quanto às espécies arbóreas, esse índice de diversidade genética estabelecido por Nei (1977), permanece elevado. Quando comparado com outras espécies como *Hancornia speciosa*, mangaba, Costa et al. (2015), encontrou He de 0,18, já Lorenzoni et al. (2014), encontrou valores de He igual a 0,5. Tal fato evidencia que a diversidade genética medida pelo índice de Nei, varia de acordo com a espécie dependendo de sua biologia reprodutiva e da saúde do ambiente onde estão inseridas.

Ao observar o teste do gargalo genético, He maior que Heq na maioria dos locus foi registrado em ambos os modelos (I.A.M. e S.M.M.), com excessão dos primers ISSR UBC 809 e 810, que em todos os locus para os indivíduos de Urbano Santos apresentaram maiores valores de Heq sobre He em ambos os modelos, evidenciando perda de alelos e um possível decréscimo populacional em curto prazo (Tabela 4). Para os locus do primer ISSR UBC 810 nas amostras de Morros no modelo S.M.M. Heq (0,250) > que He (0,24762) também foi observado. Isto corrobora para uma possível ação antrópica sobre a área de ocorrência da espécie em estudo, podendo acarretar na redução da produção de frutos assim como na propagação da espécie. Vale lembrar também que o município de Urbano Santos já esteve colocado entre os municípios que mais desmatam o cerrado, devido principalmente a expansão de áreas agrícolas como soja e eucalipto (MMA, 2012).

Tabela 4. Índices de diversidade de Nei (He) e testes de equilíbrio entre mutação e deriva genética para as populações de *P. insignis* sobre os modelos I.A.M. e S.M.M.

Primer	Q. de Locus	MR	AX	SR	CH	UB	Média	Desvio	He Total	Heq (I.A.M.)	Heq (S.M.M.)
808	3	0,53333	0,43636	0,34286	0,53333	0,53333	0,47584	0,08538	0,49014	0,203	0,244
809	5	0,41905	0,43636	0,34286	0,28571	0,00000	0,27498	0,16111	0,41475	0,203	0,248
810	5	0,24762	0,32727	0,41905	0,34286	0,00000	0,31307	0,19406	0,41475	0,205	0,250
811	7	0,47619	0,43636	0,34286	0,51429	0,47619	0,41732	0,11785	0,47082	0,204	0,246
825	7	0,51429	0,50909	0,47619	0,53333	0,51429	0,49801	0,04510	0,50213	0,200	0,242
840	4	0,47619	0,41818	0,54545	0,38096	0,49524	0,45386	0,08111	0,47445	0,205	0,244
Média		0,43564	0,38625	0,39732	0,41782	0,34839	0,39708	0,03319	0,44530		
Desvio		0,11913	0,17564	0,12017	0,12815	0,21348	0,15131	0,04183	0,07430		

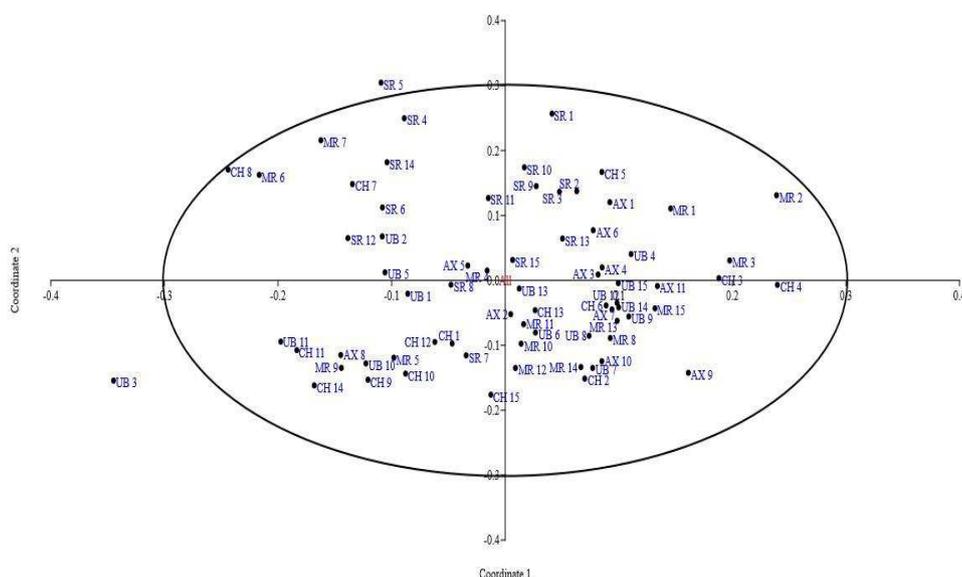
*Q. – Quantidade; MR – Morros; AX – Axixá; SR – Santa Rita; CH – Chapadinha; UB – Urbano Santos.

O índice de diversidade de Shannon (H') é comumente usado em estudos ecológicos para indicar a diversidade de espécies por área. O índice de Shannon foi de $0.0037 \leq 0.0611$ indicando baixa diversidade de indivíduos por área. O índice gera valores de 0 a 0,73 em uma escala logarítmica (LOWE et al., 2004). Os resultados estão abaixo inclusive do trabalho de Santos et al., (2017), com bacurizeiros em Chapadinha, que encontrou $0.011 \leq 0.106$, que por sua estão abaixo dos achados de Souza et al., (2013), trabalhando com genótipos do Maranhão e Piauí, que estimaram o índice de diversidade de Shannon (H') e encontraram variação de $0,120 \leq H' \leq 0,480$ e classificaram a população como apresentando altos índices de diversidade.

5.2. Análise de Agrupamento

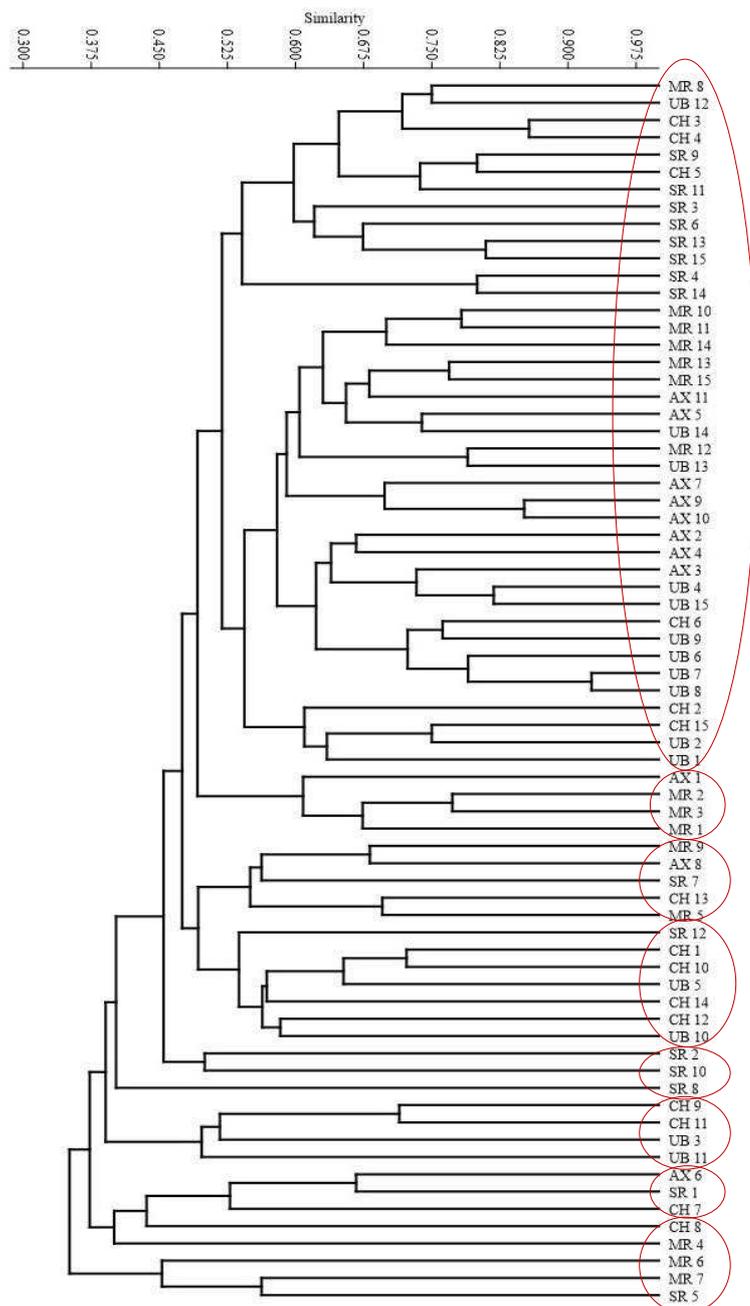
A Análise de Coordenadas Principais mostrou interação entre todos os Indivíduos (Figura 5). Tal interação corrobora os resultados da Amova que evidenciou baixa divergência entre populações, o que indica também possível troca de alelos entre os indivíduos. O PCoA é um método complementar para análise de agrupamentos e leva ao uso ideal e à educação de informações máximas de dados moleculares. Esta análise está um pouco relacionada à distribuição geográfica. A distância geográfica como fronteira pode impedir a troca de genes entre as populações e causar diferenças genéticas entre as regiões (JAFARI et al., 2019), o que não é observado nos resultados encontrados, visto a alta interação entre os indivíduos.

Figura 5. Diagrama bidimensional da primeira e segunda coordenadas (eixo), análise de coordenadas principais (PCoA) para *P. insignis*.



Os valores do coeficiente de correlação cofenética calculados na matriz de distância variaram de 0,6753 a 0,300 (Figura 6), indicando altas e baixas correlações entre os indivíduos. O dendrograma mostrou 8 grupos, com o maior contendo 40 amostras das 71, englobando indivíduos de todas as localidades, os demais agrupamentos apresentaram tamanho menor de indivíduos (Figura 6).

Figura 6. Análise de agrupamento das 71 amostras de *P. insignis* com base nos seis marcadores ISSR, utilizando o método UPGMA/Jaccard.



É possível observar também que não foi coletado nenhum clone de bacurizeiro, pois plantas de constituição genética muito próximas são reveladas no dendograma com um traço na identificação dos indivíduos. Isto pode ocorrer quando não se toma distanciamento suficiente na coleta, no mínimo 15 m, uma vez que a espécie brota por gemas localizadas nas raízes.

O coeficiente de correlação cofenética difere significativamente dos encontrados por Santos et al., (2017), $r = 0,818$ e dos resultados de Pontes et al., (2017), $r = 0,800$, mas vale ressaltar que ambos os trabalhos utilizaram uma quantidade maior de primers e por conseguinte uma maior de quantidade de locus para serem analisados, o que influencia diretamente no grau de correlação cofenética do índice de Jaccard.

5. CONCLUSÕES

Os primers utilizados se mostram promissores na caracterização genética da espécie, em especial para os primers ISSR UBC 809, 810, 811 e 825, pela quantidade locus amplificados. A diversidade genética, foi maior dentro de cada localidade, como foi possível observar na Análise de Variância Molecular (AMOVA), e baixa entre populações. Índices elevados de diversidade de Nei (H_e) foram verificados para quase todos os locus estudados com o município de Morros com a maior média geral.

Mesmo com índices médios elevados observou-se processo de gargalo genético para os locus dos primers ISSR UBC 809 e 810, nas amostras de Urbano Santos e para os locus do primer ISSR UBC 810 no modelo de mutação por etapas (S.M.M.) para as amostras de Morros, evidenciando perda de alelos e possível decréscimo populacional no curto prazo. Logo medidas de conservação *in situ* precisam ser tomadas para evitar processo de erosão genética.

A análise de Coordenadas Principais (PCoA) revelou interação entre todas as amostras estudadas, indicando possível troca de genes entre os indivíduos da Bacia Hidrográfica do Munim, com os indivíduos mais divergentes as amostras UB 3 de Urbanos Santos e SR 5 de Santa Rita. Os agrupamentos formados no dendograma também mostram isso, contudo evidenciaram baixa correlação pelo índice utilizado no trabalho, necessitando que mais primers sejam utilizados e mais locus analisados.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, A. S.; POTIGUARA, R. C. V. Caracterização anatômica foliar de espécimes de *Platonia insignis* MART. (Clusiaceae) em diferentes períodos sazonais. **Jornal de Biociência**, v. 29, n. 3, p. 562-569, 2013.
- ARAÚJO, A. M. **Paternidade e diversidade genética em caprinos no Brasil por meio de microssatélites de DNA**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- AZAMBUJA, A.K. **Interações entre *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae) e a avifauna visitante floral no cerrado do Maranhão**. Dissertação (mestrado em Ecologia). Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2008.
- BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F.; COSTA, C.G. **Sistemática de angiospermas no Brasil**. Viçosa, MG: UFV, v. 1, ed. 2, p. 309, 2002.
- BATISTA, F. J.; JARDIM, M. A. G. **Notas sobre a morfologia floral e a fenologia do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) – Clusiaceae**, no município de Bragança, estado do Pará. *Boletim Museu Paraense Emilio Goeldi*, v.1, p. 87-90, 2006.
- BECKER, M.; MANDAJI, C. M.; CATANANTE, G.; MARTY, J. L.; NUNES, G. S. Mineral and bromatological assessment and determination of the antioxidant capacity and bioactive compounds in native Amazon fruits. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, n. 2, 2018.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprint. **Plant Molecular Biology Report**, v. 19, p. 209-215, 2001.
- CARVALHO, J. E. U.; NAZARÉ, R. F. R.; NASCIMENTO, W. M. O. Características físicas e físico-químicas de um tipo de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) com rendimento industrial superior. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, p. 326-328, 2003.
- CARVALHO, J. E. U. Aspectos botânicos, origem e distribuição geográfica do bacurizeiro. In: LIMA, M. da C. (org.) **Bacuri: agrobiodiversidade**. São Luís: Eduema, p. 25-42, 2011.
- CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O. **Bacuri, *Platonia insignis***. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), ed. 2018.

CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 6. ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goldi, p. 274, 1996.

CAVALCANTE, A. N.; FEITOSA, C. M.; SANTOS, F. P. S.; SOUSA, A. P. R.; JÚNIOR, R. S. S.; SOUZA, A. A.; PINTO, B. F.; ARAÚJO, C. M.; RASHED, K. Elaboration and characterization of the inclusion complex between b-cyclodextrin and the anticholinesterase 2-oleyl-1,3-dipalmitoylglycerol extracted from the seeds of *Platonia insignis* MART. **Journal of Molecular Structure**, v. 11, n. 77, p. 286-301, 2019.

CHISTOPOULOS, M. V.; ROUSKAS, D.; TSANTILI, E.; BEBELIC, P. J. Germplasm diversity and genetic relationships among walnut (*Juglans regia* L.) cultivars and Greek local selections revealed by Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) markers. **Scientia Horticulturae**, v. 125, p. 584-592, 2010.

CLEMENT, C. R.; VENTURIERI, G.A. Bacuri and cupuassu. In: NAGY, S., SHAW, P. E.; WARDOWSKI, W. (ed.). **Fruits of tropical and subtropical origin: composition, properties, uses**. Flórida: Science Source, p. 178-192, 1990.

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, n. 4, p. 2001-2014, 1997.

COSTA, D. F.; VIEIRA, F. A.; FAJARDO, C. G.; CHAGAS, K. P. T. Diversidade genética e seleção de iniciadores ISSR em uma população natural de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 4, p. 970-976, 2015.

DJE, Y.; THAI, C. G.; BI, A. L. Z.; BAUDOIN, J. P.; BERTIN, P. Use of ISSR markers to asses genetic diversity of African edible seeded *Citrus lanatus* landraces. **Scientia Horticulturae**, v. 124, p. 159-164, 2010.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 7–50, 2005.

GUIMARÃES, A. D. G.; MOTA, M. G. C.; NAZARÉ, R. F. R. de. **Coleta de germoplasma de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) na Amazônia I.** Microrregião Campos do Marajó (Soure/Salvaterra). Boletim de Pesquisa, 132, Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, p. 23, 1992.

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

GUPTA, M.Y.S.; CHYI, J.R.S.; OWEN, J.L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theor Applied Genetics**, v. 89, p. 998–1006, 1994.

HAMMER O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleo. Electron**, v. 4, p. 1-9, 2001.

HOMMA, A. K. O.; CARVALHO, J. E. U.; MENEZES, G. B.; MENEZES, A.J.E.A.. **Manejando a planta e o homem: os bacurizeiros do nordeste paraense e da ilha de Marajó. Amazônia: Cidadania. & Desenvolvimento.** Ed. 2, 2007.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Censo agropecuário 2017.** 2018.

JAFARI, S. H.; SEPEHRY, A.; SOLTANLOO, H.; KARIMIAN, A. A. Genetic differentiation between bitter and sweet asafetida plants using ISSR markers. **Molecular Biology Reports**, v. 46, p. 1069–1078, 2019.

LIU, B.; WENDEL, J. F.; Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, p. 205-208, 2001.

LOCH, V. C.; MUNIZ, F. H. Estrutura da vegetação de cerrado stricto sensu com extração do Bacuri (*Platonia insignis* Mart.) em uma reserva extrativista, na região meio-norte do Brasil. **Biologia Neotropical**, v. 13, n. 1, p. 20-30, 2016.

LORENZONI, R. M.; SOARES, T. C. B.; SANTIAGO, V. F.; SILVA, J. A.; COELHO, R. I. Utilização de marcadores ISSR na avaliação da divergência genética entre acessos de biribazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 251-257, 2014.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological genetics: design, analysis and application**. Blackwell Publishing, Oxford, p. 344, 2004.

MENEZES, M. P. C. **Variabilidade e relações genéticas entre raças caprinas nativas brasileiras, ibéricas e canárias**. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Universidade Federal do Ceará, Areia, 2005.

MMA. **Ministério do Meio Ambiente**, PORTARIA Nº. 97, DE 22 DE MARÇO DE 2012.

MORAES, V. H. F.; MÜLLER, C. H.; SOUZA, A. G. C. de; ANTONIO, I. C. Native fruit species of economic potential from Brazilian Amazon. **Angewandte Botanik**, v. 68, p. 4752, 1994.

NASCIMENTO, W. M. O.; CARVALHO, J. E. U.; MULLER, C. H. Ocorrência e distribuição geográfica do bacurizeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 29, n. 3, p. 657 – 660, 2007.

NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Ann. Hum. Genetics**, v. 41, p. 225-233, 1977.

PONTES, L. C. G.; MOURA, E. F.; MOURA, M. F.; ROGRIGUES, S. M.; OLIVEIRA, M. S. P.; CARVALHO, J. E. U.; THERRIER, J. Molecular characterization of progenies of bacurizeiro (*Platonia insignis*) from Marajó Island, northeastern Amazon. **Acta Amazonica**, v. 47, n. 4, p. 293-300, 2017.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.

SALIMATH, S.S., OLIVEIRA, A.C. GODWIN, I.D., BENNETZEN, J.L. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. **Genome**, p. 757-763., 1995.

SANTOS, E. M.; MONTEIRO NETO, C. A. S.; NASCIMENTO, C. A. J.; MUNIZ, F. H.; BARROS, J. R. S. Genetic and population diversity of bacuri (*Platonia insignis* Mart.) in Chapada Limpa extractive reserve, Maranhão State, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, p. 2317-2325. 2017.

SANTOS, R. F.; ARAUJO, J. R. G.; NEVES JÚNIOR, A. C. V.; MELO, P. A. F. R.; SILVA, L. P. V.; SANTOS, W. F. S.; MENDES, B. M. M.; ROCHA, A. E.; FURTADO, M. B.; MESQUITA, M. L. R. Biometric and Chemical Characterization of Fruits From Selections of *Platonia insignis* Mart., Native of the State of Maranhão, Brazil. **Journal of Agricultural Science**, vol. 11, n. 2, 2019.

SILVA, R. G.; CHAVES, M. C. L.; ARNHOLD, E.; CRUZ, C. D. Repetibilidade e correlações fenotípicas de caracteres do fruto de bacuri no estado do Maranhão. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, p. 587-591, 2009.

SOUZA, V. A. B.; ARAÚJO, E. C. E.; VASCONCELO, L. F. L.; ALVES, R. E. **Bacurizeiro** (*Platonia insignis* Mart.) (p. 72). Jaboticabal: Funep, 2000.

SOUSA, I. G. de B. **Caracterização morfológica e molecular do Bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Piauí, 2011.

SOUZA, I. G. B.; SOUZA, V. A. B.; LIMA, P. S. C. Molecular characterization of *Platonia insignis* Mart. (“Bacurizeiro”) using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p. 3835–3845, 2013.

SOUZA, I. G. B. **Aspectos biológicos, econômicos e genéticos do bacurizeiro: uma frutífera nativa da região amazônica com expansão na região meio-norte do Brasil**. Editora Espaço Acadêmico, 2018.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. (Eds.). **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. Belém: IMAZON/CIFOR, p. 304, 2005.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v. 11, p. 30-40, 1962.

TANTASAWAT, P.; TRONGCHUEN, J.; PRAJONGJAI, T.; SEEHALAK, W.; JITTAYASOTHORN, Y. Variety identification and comparative analysis of genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculate* spp. *sesquipedalis*) using morphological characters, SRR and ISSR analysis. **Scientia Horticulturae**, v. 124, p. 204-216, 2010.

THAKUR, J.; DWIVEDI, M. D.; SOURABH, P.; UNİYAL, P. L.; PANDEY, A. K. Genetic Homogeneity Revealed Using SCoT, ISSR and RAPD Markers in Micropropagated

Pittosporum eriocarpum Royle- An Endemic and Endangered Medicinal Plant. **PLOS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1-17, 2016.

VASCONCELOS, F. J.; FREITAS, J. A.; LIMA, V. M. O. C.; MONTEIRO, L. V.; PEREIRA, S. J. **Madeiras tropicais de uso industrial do Maranhão: características tecnológicas**. Manaus: INPA, São Luiz: UFMA, p. 96. 2001.

VIANA, L. S.; PEREIRA, T. N. S.; SANTOS, E. A.; VIANA, A. P.; PEREIRA, H. C. C.; RAMOS, A. A. B.; ROSSI, A. A. B. ISSR and SSR markers for determining genetic relationships among three wild species of *Passiflora*. **Genetics and Molecular Research**, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2019.

VILLACHICA, H.; CARVALHO, J. E. U.; MÜLLER, C. H.; DIAZ, S. C.; ALMANZA, M. **Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia**. Lima: Tratado de Cooperación Amazônica, Secretaria Pro-Tempore, p. 50-55, 1996.

YAACOB, O.; TINDALL, H.D. *Mangosteen cultivation*. Rome: FAO, (FAO Plant Production and Protection Paper, 129), p. 100, 1995.

WRIGHT, S. **Variability within and among natural populations**. vol. 4. The University of Chicago Press, Chicago. 1978.