



Diversidade genética de *Copernicia prunifera* com o uso de marcadores moleculares ISSR

Fábio de Almeida Vieira¹, Rodrigo Ferreira de Sousa², Richeliel Albert Rodrigues Silva¹,
Cristiane Gouvêa Fajardo¹, Wagner Franco Molina³

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias, Escola Agrícola de Jundiá - Engenharia Florestal, RN 160, km 03, Distrito de Jundiá, CEP 59280-000, Macaíba-RN, Brasil. Caixa Postal 7. E-mail: vieirafa@yahoo.com.br; richeliel@yahoo.com.br; genegoista00@gmail.com

² Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Campus III, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Rodovia PB 079, km 12, CEP 58397-000, Areia-PB, Brasil. Caixa Postal 66. E-mail: rodrigofsousa72@yahoo.com.br

³ Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Departamento de Biologia Celular e Genética, Laboratório de Genética de Recursos Marinhos, Campus Universitário, 3000, Lagoa Nova, CEP 59078-970, Natal-RN, Brasil. E-mail: molinawf@yahoo.com.br

RESUMO

O objetivo desse estudo foi selecionar primers ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) para estudos da estrutura genética, assim como quantificar a variabilidade genética de uma população natural da *C. prunifera*. Foram amostrados 37 indivíduos no município Macaíba, Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. Foram testados 17 primers ISSR, sendo que 12 amplificaram o DNA. Os primers que tiveram maior porcentagem de locos polimórficos foram UBC 841 (16,36%), UBC 842 (15,45%), UBC 857 (12,73%), UBC 859 (10,90%), UBC 840 (10,90%), UBC 813 (10%) e UBC 827 (8,18%), totalizando 93 dos 110 locos gerados. O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) de cada primer selecionado variou entre 0,057 (UBC 859) e 0,444 (UBC 841). O número ótimo de locos para se estimar confiavelmente a diversidade genética para esse trabalho foi de 76 locos. Foi encontrada alta diversidade genética, com o número de alelos observados ($n_a = 2,00$), alelos efetivos ($n_e = 1,46$), índice de diversidade de Nei ($H_e = 0,28$) e índice de Shannon ($H_o = 0,44$). O valor da coancestria se manteve dentro do intervalo de confiança ($P > 0,05$), indicando ausência de estrutura genética espacial. Os marcadores ISSR se mostraram eficientes na caracterização genotípica dos indivíduos de carnaúba, servindo com subsídio para planos de manejo e conservação da espécie.

Palavras-chave: Arecaceae, carnaúba, nordeste do Brasil, variação genética

Genetic diversity of Copernicia prunifera using ISSR molecular markers

ABSTRACT

The aim of this study was to select primers ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) for studies of the genetic structure, and to quantify the genetic variability in a natural population of *C. prunifera*. Thirty seven individuals were sampled in the municipality Macaíba, Rio Grande do Norte, Northeast Brazil. Seventeen ISSR primers were tested, of which 12 amplified DNA and of these, seven were selected to characterize the structure and genetic diversity of the population. The primers that had the highest percentage of polymorphic loci were UBC 841 (16.36%), UBC 842 (15.45%), UBC 857 (12.73%), UBC 859 (10.90%), UBC 840 (10.90%), UBC 813 (10%) and UBC 827 (8.18%), totaling 93 of the 110 loci generated. The polymorphic information content (PIC) of each selected primer ranged from 0.057 (UBC 859) and 0.444 (UBC 841). The optimal number of loci to reliably estimate the genetic diversity for this work was 76 loci, ie, when the correlation reached 0.998 and the stress was less than 0.05. High genetic diversity was found, with the number of observed alleles ($n_a = 2.00$), effective alleles ($n_e = 1.46$), Nei's diversity index ($H_e = 0.28$) and Shannon index ($H_o = 0.44$). The value of the coancestry remained within the confidence interval ($P > 0.05$), indicating no spatial genetic structure, regardless of the distance between plants. ISSR markers were efficient in genetic characterization of individuals' carnauba serving with allowance for management and conservation of the species.

Key words: Arecaceae, carnauba, northeast Brazil, genetic variation

Introdução

Copernicia prunifera ou carnaúba é uma espécie da família Arecaceae, nativa do nordeste brasileiro, tendo sua distribuição próxima de rios e áreas inundáveis (Rodrigues et al., 2013). Apresenta-se adaptada a baixos índices pluviométricos, solos salinizados e com pouco oxigênio (Arruda & Calbo, 2004). Por ser bastante versátil em relação às formas de uso, essa palmeira tem grande importância econômica e cultural na região onde ocorre (Rodrigues et al. 2013), sendo o pó cerífero o principal produto de exploração e comercialização. No estado potiguar os municípios de Assú e Mossoró destacam-se com indústrias de beneficiamento da cera de carnaúba, já os municípios Apodi, Upanema e Felipe Guerra são os maiores produtores de pó de *C. prunifera* (Queiroga et al., 2013).

O pó cerífero desempenha um papel fundamental na planta, pois auxilia na redução da transpiração e protege contra a invasão de patógenos (Taiz & Zeiger, 2009). As folhas palmadas servem de forragem, cobertura de abrigos para humanos e outros animais e na confecção de artesanato; os frutos são consumidos por animais domésticos e selvagens. O caule em forma de estipe pode atingir de 10 a 15 metros de altura e diâmetro entre 15 e 25 centímetros, é empregado na construção civil e rural, como construção de casas, currais, entre outros. As raízes são fasciculadas e possuem propriedades medicinais (Queiroga et al., 2013; Rodrigues et al., 2013).

Entretanto, atividades econômicas como expansão das terras agrícolas, carcinicultura e pecuária tem causado fragmentação nas populações naturais de carnaúba (Reis et al., 2011), sendo assim, se faz necessários estudos que possibilitem a conservação ecológica e genética dessas populações afetadas. O conhecimento dos níveis de variabilidade genética e da distribuição espacial dos genótipos dentro das populações são aspectos fundamentais quando se pretende a conservação *in situ* de uma espécie (Brandão et al., 2011; Melo Junior et al., 2015). A persistência de populações viáveis, do ponto de vista evolutivo das florestas tropicais, é crucial para a preservação dos ecossistemas e da diversidade biológica global (Vieira et al., 2015). A estimativa da variabilidade genética em populações naturais é base para resolução de numerosos problemas no campo da genética de populações, tais como endogamia, processos evolutivos, entre outros (Vieira & Carvalho, 2008).

Nesse contexto, os marcadores moleculares são utilizados em trabalhos que visam identificar a variabilidade genética entre populações e entre indivíduos de uma mesma população (Caixeta et al., 2003; Souza et al., 2008), pois são capazes de detectar polimorfismo dos ácidos desoxirribonucleicos (Brandão et al., 2011; Nybom, 2004). Entre os principais marcadores moleculares está o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), muito utilizado por ser de baixo custo, quando comparados aos SSR (microsatélites) e também eficiente na detecção de polimorfismo (Santana et al.; 2011). Esses marcadores são fragmentos de DNA amplificados pela PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) (Reddy et al., 2012).

Os primers são oligonucleotídeos sintéticos, iniciadores da replicação do DNA, constituídos geralmente com 15 a 20 bases nitrogenadas em uma fita simples. Os marcadores entre repetições de sequências simples (ISSRs) utilizam um primer

composto por repetições di-, tri-, tetra- ou pentanucleotídicas, com ou sem uma sequência de ancoragem de 1 a 3 nucleotídeos (a ausência da sequência de ancoragem diminui a reprodutibilidade e especificidade do primer) que tem os microsatélites como sequência alvo (Zietkiewicz et al., 1994). Durante a amplificação do DNA genômico via PCR, o primer único – só uma das fitas de DNA é amplificada – de ISSR produz múltiplos fragmentos de tamanhos variados (bandas), cujo padrão é analisado após separação por eletroforese para avaliar a diversidade genética. Devido à herança dominante, a presença do fragmento (banda) pode representar o homocigoto dominante ou o heterocigoto, enquanto a ausência pode ser infligida o estado homocigoto recessivo, à ocorrência de inserções/deleções, ou à adição ou perda de um sítio de reconhecimento do primer (Zietkiewicz et al., 1994). Apesar do uso contínuo de marcadores ISSR (Brandão et al., 2011; Duarte et al., 2015; Melo Junior et al., 2015), ainda são escassos os estudos envolvendo a metodologia de seleção e indicação do número mínimo de locos para uso na genética de populações (Chagas et al., 2015; Fajardo et al., 2014; Mendonça et al., 2013).

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo selecionar primers ISSR para estudos da estrutura genética, assim como quantificar a variabilidade genética de uma população natural da *C. prunifera*.

Material e Métodos

A amostragem foi realizada em uma população remanescente, nas coordenadas 5°53'57"S, 35°22'59"W, no município de Macaíba/RN, Brasil. O fragmento onde a população está inserida ocupa uma área de, aproximadamente, 800,0 m². Foi demarcada uma parcela com dimensões de 20 m x 40 m, onde foi tomada nota das distâncias de cada indivíduo em relação às coordenadas cartesianas X e Y da parcela. Foram amostrados um total de 37 indivíduos contidos na parcela.

As amostras foliares foram acondicionadas em tubos plásticos de 2 mL contendo CTAB 2X (*cationic hexadecyl trimethylammonium bromide*), identificados, e encaminhados ao Laboratório de Genética e Melhoramento Florestal – UFRN, Macaíba/RN. Em seguida estas foram armazenadas em freezer a -20°C, até o momento da extração do DNA.

O DNA foi extraído pelo método de CTAB de Doyle & Doyle (1987), com modificações. No protocolo, utilizou-se 100 mM de Tris pH 8,0; 1,4 M de NaCl; 20 mM de EDTA pH 8,0; 2% (p/v) CTAB; 1% (p/v) PVP-40 e 0,2% (v/v) de β-mercaptoetanol pré-aquecido a 65°C em banho maria. Após a extração, o DNA estoque foi armazenado em freezer a -20°C. A concentração de DNA total foi estimada em gel de agarose 0,8% corados com GelRed™. Em seguida o DNA foi diluído e mantido em geladeira até o momento do uso.

Posteriormente, realizou-se a reação da polimerase em cadeia (PCR), utilizando 17 primers ISSR da University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canadá), com comprimento entre 14 e 18 bases nitrogenadas e %CG entre 43 e 67%. A temperatura de anelamento utilizada foi de 47°C. O mix de PCR foi constituído de Buffer (10 x), BSA (1,0 mg.mL⁻¹), MgCl₂ (50 mM), dNTP (2,5 mM), primer (2 μM),

uma unidade de Taq Polimerase Phoeutria® (U.µl⁻¹), DNA (50 ng) e água ultra pura, em um volume final de 12 µL por amostra. As reações de PCR foram feitas em Termociclador automático Veriti com bloco de 96 poços, no qual as amostras, inicialmente, foram desnaturadas a 94°C, por 5 minutos, seguidas por 37 ciclos de amplificação, tendo cada ciclo submetido às amostras a 94°C, por 15 segundos, em seguida a 47°C, por 30 segundos e, por fim, a 72°C, por 1 minuto. Após os ciclos, o processo foi finalizado a 72°C, por 7 minutos e resfriamento a 4°C.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em cuba horizontal, em gel de agarose 1,5% (p/v), em tampão TBE 0,5X (Tris-Borato EDTA), a uma voltagem de 120 V, por duas horas e meia. Foi utilizado o marcador de peso molecular (Ladder Invitrogen™) de 100 pares de bases. Decorrido o tempo de eletroforese, os géis foram retirados da cuba e fotografados com a incidência de luz ultravioleta com auxílio do equipamento E-Box VX2, revelando os fragmentos de DNA corados com GelRed™.

Os primers com maior número de fragmentos e boa resolução foram selecionados, descartando-se os resultados dos primers que apresentaram bandas com fraca intensidade ou baixa definição.

Com o intuito de verificar a quantidade ótima de fragmentos polimórficos para os estudos de genética de populações da *C. prunifera*, realizou-se a análise de *bootstrap* (Manly, 1997). Para cada par de plantas, foi obtida a similaridade genética estimada a partir de simulações com reamostragens de diferentes tamanhos (1, 6, 11, ..., 93 bandas), com 10.000 permutações por meio do software GENES (Cruz, 2001). Foram obtidas várias estimativas de correlação (*r*) entre os valores da matriz de similaridade genética original e a matriz de similaridade genética simulada, com base nos diferentes números de bandas. Além disso, obteve-se o valor de estresse (*E*), que indica o ajuste entre a matriz original e a matriz simulada. Quando o valor de estresse assume valor inferior a 0,05, o número de fragmentos é considerado suficiente para as análises (Kruskal, 1964).

O PIC (conteúdo de informação polimórfica) foi calculado para testar a eficiência dos primers ISSR em apontar o polimorfismo entre dois indivíduos, tendo como indicadores a ausência ou presença de bandas. Para isso, foi utilizada a fórmula proposta por Anderson et al. (1993):

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

onde: P_{ij} é a frequência do alelo “j” no marcador “i”.

Para analisar a diversidade genética dentro da população estudada, foi utilizado o programa POPGENE versão 1.3 (Yeh et al., 1997), onde foram analisados o número de alelos observados (n_a), número de alelos efetivos (n_e), diversidade genética de Nei (H_e) e Índice de Shanon (I).

Para determinar a EGE, foi calculado o coeficiente de coancestria (θ₃₀) proposto por Loiselle et al. (1995), utilizando o programa SPAGeDi (Hardy & Vekemans, 2002). Esse coeficiente consiste na probabilidade de que dois alelos

homólogos, retirados aleatoriamente de dois indivíduos sejam idênticos por descendência, ou seja, são cópias de um mesmo alelo de um antecessor recente (Sebbenn & Seoane, 2005).

Resultados e Discussão

O método de extração do DNA proposto por Doyle & Doyle (1987) mostrou-se eficiente, pois houve amplificação do DNA nas reações de PCR, contribuindo para a detecção de polimorfismo na população de *C. prunifera*. Dos 17 primers ISSR testados, 12 primers apresentaram sucesso na PCR, ou seja, amplificaram o DNA. Esses primers geraram um total de 110 bandas, variando entre 3 e 18 bandas, com média de 9,17 bandas por primer. Santana et al. (2011) selecionaram 25 primers ISSR para umbu (*Spondias* sp.) e obtiveram 249 fragmentos (bandas), onde a quantidade de bandas por inicializador variou entre 5 e 16, obtendo a média de 10 fragmentos por primer. Entretanto, para o presente estudo, foram selecionados sete primers ISSR com base na melhor resolução dos fragmentos e também no maior número de locos, visando à otimização da genotipagem para os demais indivíduos da espécie.

Os primers que tiveram maior porcentagem de locos foram UBC 841 (16,36%), UBC 842 (15,45%), UBC 857 (12,73%), UBC 859 (10,90%), UBC 840 (10,90%), UBC 813 (10%) e UBC 827 (8,18%), totalizando 93 dos 110 locos gerados (Tabela 1).

Santos et al. (2013) testaram 10 primers UBC em progênies F2 de *Arachis hypogaea* L. (amendoim) e obtiveram um total de 108 bandas, sendo que os primers que mais se destacaram em relação ao número de bandas foram UBC 818, motivo (motif) da repetição (CA)8-G, e UBC 842, motif (GA)8Y-G. Duarte et al. (2015) trabalharam com a espécie *Ficus bonijesuslapensis* R.M. Castro e selecionaram nove primers, sendo oito do tipo UBC. Com isso, detectaram 75 locos, onde observaram o número mínimo de loco nos primers JOHN, motif (GA)7Y-C e UBC 825, motif (AC)8-T, com cinco locos cada, e o número máximo de locos no primer UBC 857, motif (AC)8-YG, com 18 locos. Assim, nota-se aparente eficiência do primer UBC 842 e UBC 857 na detecção de bandas em diferentes espécies, tornando-o potencialmente aceito em outros trabalhos genéticos.

Na Figura 1 se mostra o aparecimento dos locos utilizando o primer UBC 827.

O número ótimo de locos para se estimar confiavelmente a diversidade genética para esse trabalho foi de 76 locos. A partir desse número a correlação atingiu 0,998 (máximo = 1) e valor de estresse de 0,043 (Figuras 2A; 2B).

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos dos primers ISSR, número de locos (NL) e o valor de PIC de cada primer

Primer ISSR	Sequência (5' – 3')	NL	PIC
UBC 813 (CT)8-T	CTCTCTCTCTCTCTT	11	0,280
UBC 827 (AC)8G	ACACACACACACACG	9	0,264
UBC 840 (GA)8-YT	GAGAGAGAGAGAGAYT	12	0,393
UBC 841 (GA)8-YC	GAGAGAGAGAGAGAYC	18	0,444
UBC 842 (GA)8-YG	GAGAGAGAGAGAGAYG	17	0,419
UBC 857 (AC)8-YG	ACACACACACACACYG	14	0,079
UBC 859 (TG)8-RC	TGTGTGTGTGTGTGRC	12	0,057
Média		13,28	0,277

R = purina (A ou G) e Y = pirimidina (C ou T)

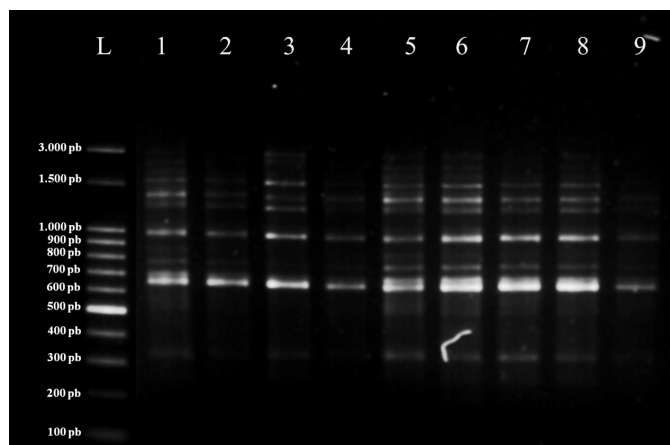


Figura 1. Padrão de fragmentos ISSR resultantes da amplificação do primer UBC 827 de nove plantas de *Copernicia prunifera*. L = Ladder, pb, pares de bases

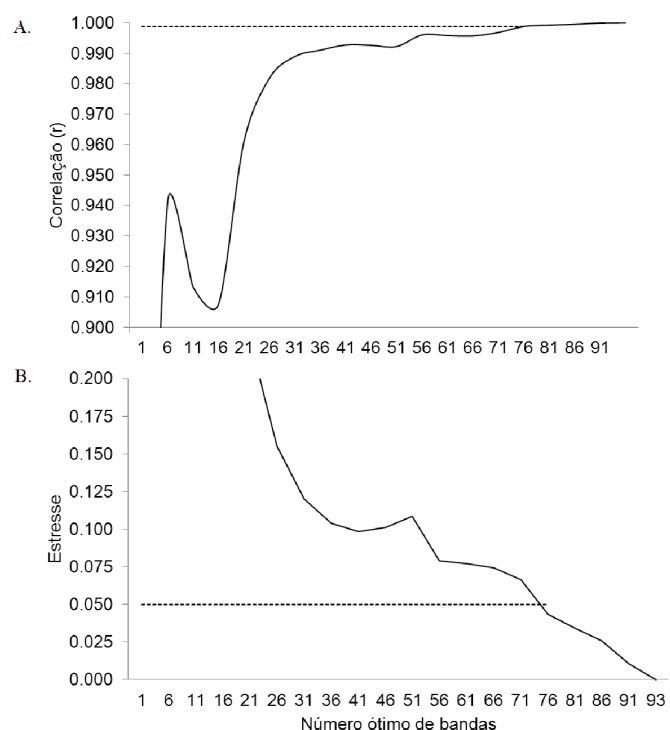


Figura 2. Estimativas das correlações (A) entre as similaridades genéticas obtidas pela análise *bootstrap* para números crescentes de marcadores ISSR polimórficos e valores de estresse (B), que indicam o número mínimo ideal de bandas para as análises genéticas de *Copernicia prunifera* (76 bandas)

Segundo Kruskal (1964), quando o valor de estresse é igual ou menor que 0,05 as estimativas são de alta exatidão. Como neste estudo o número de locos encontrado ($n = 93$) foi bem acima do estabelecido com número ótimo ($n = 76$), pode-se inferir que as estimativas de diversidade genética que foram obtidas entre os indivíduos de *C. prunifera* apresentaram excelente precisão.

Torezan et al. (2005) observaram que 50 bandas eram suficientes para estimar a variabilidade genética de *Aspidosperma polyneuron* Mueller Argoviensis Mart. Ferreira (2011) analisou 41 bandas para inferir com confiança a diversidade genética de *Annona crassiflora* Mart. Já Chagas et al. (2015) usaram 68 bandas para estimar a diversidade genética de *Elaeis guineensis* Jacq. com o uso de marcadores ISSR.

O PIC de cada inicializador utilizado variou entre 0,057 e 0,444 (Tabela 1). O mesmo serve para definir o quão eficiente é o marcador molecular em relação à detecção de polimorfismo entre indivíduos (Botstein et al., 1980). Segundo Botstein et al. (1980), os marcadores moleculares são classificados como satisfatórios em conteúdo informativo quando apresentam PIC superior a 0,5, medianamente informativos com valores que vão de 0,25 a 0,5 e pouco informativo com valores inferiores a 0,25. Seguindo essa classificação, a maior parte dos marcadores moleculares do presente trabalho é tida como medianamente informativos (cinco marcadores), os demais são pouco informativos (dois marcadores). Oliveira et al. (2010) utilizando sete marcadores SSR na espécie *Euterpe oleracea* Mart. (açai) encontraram valores de PIC variando entre 0,60 e 0,86, sendo esses marcadores muito informativos de acordo com a classificação de Botstein et al. (1980), superando os marcadores ISSR utilizados no presente trabalho. Ferreira (2011), trabalhando com *Annona crassiflora*, selecionou 10 primers ISSR, onde todos foram classificados como medianamente informativos, pois os valores de PIC para cada primer variou entre 0,34 e 0,47.

Na análise demográfica da população ($N = 37$), os indivíduos foram classificados em adultos, com eventos reprodutivos e altura média de 8,11 metros ($n = 9$); jovens, com altura média de 4,05 metros e sem eventos reprodutivos ($n = 5$); e regenerantes, com altura variando entre 0,20 – 1,00 m ($n = 23$). A Figura 3 ilustra a distribuição dos indivíduos na parcela.

O valor médio dos alelos observados foi de 2,00, alelos efetivos 1,46 e índice de diversidade de Nei igual a 0,288. Pádua (2011) utilizando marcadores ISSR analisou a diversidade genética em dez populações naturais de *Eremanthus erythopappus* (DC.) Macleish no Estado de Minas Gerais e obteve valores médios de 1,79 para alelos observados, 1,53 alelos efetivos e 0,30 para a diversidade genética de Nei, ou seja, as populações de *E. erythopappus* e a população de *C. prunifera* do presente trabalho apresentaram, numericamente, diversidade genética semelhante.

O índice de Shannon no presente trabalho foi de 0,44. Segundo Pádua (2011) o valor desse índice pode variar entre

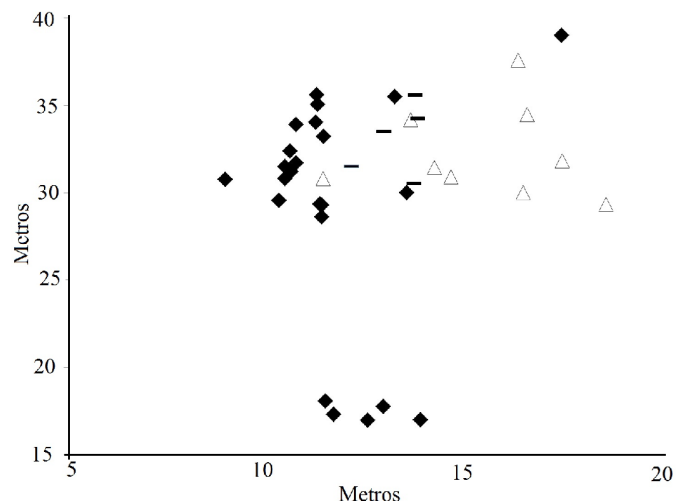


Figura 3. Distribuição dos indivíduos de *C. prunifera* na parcela (20 m x 40 m). Adultos, triângulo sem preenchimento; jovens, linha com preenchimento; e regenerantes, losango com preenchimento

0 e 1, sendo que quanto mais próximo de 1 mais diversificada genotipicamente é a população. Tomando por base essa definição, podemos observar que a população estudada possui diversidade genética intermediária.

Roncal et al. (2006) estudando a variabilidade genética de uma população de *Geonoma macrostachys* Mart. (Areceae), por meio de marcadores ISSR, encontraram valores inferiores para diversidade de Nei (0,227) e para o índice de Sannon (0,323), quando comparados com os valores encontrados no presente trabalho. Diferenças na diversidade genética interespecíficas estão associadas a história de vida das espécies, incluindo o hábito, distribuição geográfica, sistema de reprodução, mecanismos de dispersão de sementes e estádios de sucessão (Nyblom, 2004).

Os resultados estatísticos não apontaram grau de parentesco significativo entre os indivíduos, independentemente da distância geográfica entre eles (Figura 4). O pico de maior proximidade genética (coancestria) foi registrado na distância de quatro metros, enquanto que o pico de divergência genética foi observado na distância 14 metros, entretanto, todos não significativos.

Possivelmente o sistema de dispersão por morcegos (Queiroga et al., 2013) esteja contribuindo diretamente para a falta de estruturação genética espacial dentro da população estudada, podendo a *C. prunifera* ter suas sementes dispersas aleatoriamente por dezenas ou centenas de metros. Porém, a ausência de estruturação genética espacial observada na população não significa que não existam indivíduos aparentados.

Ferreira (2011) encontrou coeficiente de coancestria significativa na classe de distância compreendida entre 98 e 288 metros em uma população de *Annona crassiflora* no Estado de Minas Gerais, Brasil. Brandão et al. (2011) encontraram valor de coancestria positivo na classe de distância correspondente a 70 metros para populações de *Myrcia splendens* (SW.) DC. em sistema de fragmentos-corredores na região sul de Minas Gerais. Esses dados mostram que os indivíduos das duas populações das espécies distintas citadas acima são mais aparentados das árvores mais distantes, ou seja, quanto mais próximos espacialmente forem os indivíduos, menos aparentados eles serão, enquanto que no presente trabalho a distribuição genética espacial dos indivíduos foi aleatória para todas as classes de distância.

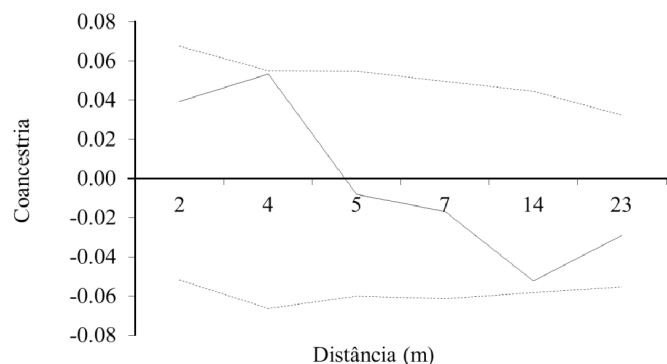


Figura 4. Relação entre grau de parentesco (coancestria) e as classes de distância entre os indivíduos. Intervalo de confiança (linhas pontilhadas), valor de coancestria (linha contínua)

Os fatores que podem levar uma população a apresentar estrutura genética espacial significativa são, principalmente, o efeito fundador (população originada por um ou poucos genótipos), deriva genética (oscilação aleatória das frequências alélicas ao longo do tempo) e dispersão restrita de sementes (Defavari et al., 2009). Diante do exposto, se faz necessário a realização de estudos que determinem a variação genética espacial entre populações e entre estágios de desenvolvimento (regenerantes, jovens e adultos) dentro das populações.

Conclusões

Os marcadores ISSR deste estudo são eficientes para a quantificação da diversidade genética da *C. prunifera*, e para identificar o polimorfismo entre os indivíduos na população.

A população estudada tem diversidade genética elevada e EGE aleatória, mostrando não haver relação de parentesco significativo entre os indivíduos independentemente da distância entre eles.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro concedido, processo de nº 562828/2010-9.

Literatura Citada

- Anderson, J. A.; Churchill, G. A.; Autrique, J. E.; Tanksley, S. D.; Sorrells, M. E. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, v.36, n.1, p.181-186, 1993. <<http://dx.doi.org/10.1139/g93-024>>.
- Arruda, G. M. T.; Calbo, M. E. R. Efeitos da inundação no crescimento, trocas gasosas e porosidade radicular da carnaúba (*Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore). *Acta Botânica Brasileira*, v.18, n.2, p.219-224. 2004. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062004000200002>>.
- Botstein, D.; White, R. L.; Skolnick, M.; Davis, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, v.32, n.2, p.314-331. 1980. <https://www.princeton.edu/genomics/botstein/publications/1981_Botstein_Construction.pdf>. 26 Jan. 2014.
- Brandão, M. M.; Vieira, F. A.; Carvalho, D. Fine-scale genetic structure of *Myrcia splendens* (Myrtaceae). *Revista Árvore*, v. 35, n. 5, p. 957-964. 2011. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622011000600001>>.
- Caixeta, R. P.; Carvalho, D.; Rosado, S. C. S.; Truguilho, P. F. Variações genéticas em populações de *Eucalyptus* spp. detectadas por meio de marcadores moleculares. *Revista Árvore*, v.27, n.3, p.357-363, 2003. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622003000300012>>.
- Chagas, K. P. T.; Sousa, R. F.; Fajardo, C. G.; Vieira, F. A. Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineensis*. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v.10, n.1, p.147-152, 2015. <<http://dx.doi.org/10.5039/agraria.v10i1a5133>>.

- Cruz, C.D. Programa GENES: versão Windows. Viçosa: UFV, 2001. 642 p.
- Defavari, G. R.; Tarazi, R.; Moreno, M. A.; Ferraz, E. M.; GAndara, F. B.; Kageyama, P. Y. Estrutura genética espacial intrapopulacional de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne na Estação Ecológica de Itirapina, SP. *Scientia Forestalis*, v.37, n.81, p.89-98, 2009. <<http://www.ipef.br/publicacoes/scientia/nr81/cap10.pdf>>. 15 Jan. 2014.
- Doyle, J. J.; Doyle, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, n.1, p.13-15, 1987.
- Duarte, J. F.; Carvalho, D.; Vieira, F. A. Genetic conservation of *Ficus bonijesulapensis* R.M. Castro in a dry forest on limestone outcrops. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.59, p.54-62, 2015. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2015.01.008>>.
- Fajardo, C. G.; Vieira, F. A.; Molina, W. F. Interspecific genetic analysis of orchids in Brazil using molecular markers. *Plant Systematics and Evolution*, v. 300, p. 1825-1832, 2014. <<http://dx.doi.org/10.1007/s00606-014-1009-9>>.
- Ferreira, M. F. M. Análises genéticas de *Annona crassiflora* (Annonaceae): implicações para a conservação da espécie. Lavras: UFLA, 2011. 127p. Dissertação Mestrado. <<https://sigaa.ufrn.br/sigaa/verProducao?idProducao=1008872&key=40336b2335e5f60b04897b7053b56465>>. 17 Mar. 2015.
- Hardy, O. J.; Vekemans, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, v.2, n.4, p.618-620. 2002. <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00305.x>>.
- Kruskal, J. B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a no metric hypothesis. *Psychometrika*, v.29, n.1, p.1-27. 1964. <<http://dx.doi.org/10.1007/BF02289565>>.
- Loiselle, B. A.; Sork, V. L.; Nason, J.; Graham, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, v.82, n.11, p.1420-1425. 1995. <<http://dx.doi.org/10.2307/2445869>>.
- Manly, B. F. J. Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in Biology. 2.ed. London: Chapman and Hall, 1997. 300p.
- Melo Júnior, A. F.; Carvalho, D.; Brandão, M. M.; Sousa, L. G.; Vieira, F. A.; Menezes, E. V.; Royo, V. A.; Oliveira, D. A. Spatial genetic structure of *Cavanillesia arborea* K. Schum. (Malvaceae) in seasonally dry tropical forest: implications for conservation. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.58, p.114-119, 2015. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2014.11.004>>.
- Mendonça, E. G.; de Souza, A. M.; Vieira, F. A.; Estopa, R. A.; Reis, C. A. F.; Carvalho, D. Using random amplified polymorphic DNA to assess genetic diversity and structure of natural *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) populations in riparian forests. *International Journal of Forestry Research*, v.2014, p.1-8, 2014. <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/305286>>.
- Nybom, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, v.13, n.5, p.1143-1155. 2004. <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02141.x>>.
- Oliveira, M. S. P.; Santos, J. B.; Amorim, E. P.; Ferreira, D. F. Variabilidade genética entre acessos de açazeiro utilizando marcadores microssatélites. *Ciência e Agrotecnologia*, v.34, n.5, p.1253-1260. 2010. <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542010000500025>>.
- Pádua, J. A. R. Genética da paisagem: áreas prioritárias para manejo e a conservação de *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish no Estado de Minas Gerais. Lavras: UFLA, 2001. 127p. Dissertação Mestrado. <<http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/5005>>. 08 Mai. 2015.
- Queiroga, V. P.; Ramos, G. A.; Assunção, M. V.; Almeida, F. A. C. Carnaubeira: tecnologia de plantio e aproveitamento industrial. Campina Grande: UFCG, 2013. 204p.
- Reddy, M. P.; Sarla, N.; Siddiq, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, v.128, n.1, p.9-17. 2002. <<http://dx.doi.org/10.1023/A:1020691618797>>.
- Reis, R. G. E.; Pereira, M. S.; Gonçalves, N. R.; Pereira, D. S.; Bezerra, A. M. E. Emergência e qualidade de mudas de *Copernicia prunifera* em função da embebição das sementes e sombreamento. *Revista Caatinga*, v.24, n.4, p.43-49. 2011. <<http://periodicos.ufersa.edu.br/revistas/index.php/sistema/article/viewFile/2012/pdf>>. 22 Jan. 2014.
- Rodrigues, L. C.; Silva, A. A.; Silva, R. B.; Oliveira, A. F. M.; Andrade, L. H. C. Conhecimento e uso da carnaúba e da algaroba em comunidades do sertão do Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil. *Revista Árvore*, v.37, n.3, p.451-457. 2013. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622013000300008>>.
- Roncal, J.; Francisco-Ortega, J.; Lewis, C. E. An evaluation of the taxonomic distinctness of two *Geonoma macrostachys* (Arecaceae) varieties based on intersimple sequence repeat (ISSR) variation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.153, n.4, p.381-392, 2006. <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.2007.00619.x>>.
- Santana, I. B. B.; Oliveira, E. J.; Soares Filho, W. S.; Ritzinger, R.; Amorim, E. P.; Costa, M. A. P. C.; Moreira, R. F. C. Variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.33, n.3, p.868-876, 2011. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452011005000090>>.
- Santos, R. C.; Queiroz, C. M.; Batista, G. L.; Silva, C. R. C.; Pinheiro, M. P. N.; Galvão Filho, A. L. A.; Melo Filho, P. A.; Lima, L. M. Variabilidade de progênies F2 de amendoim geradas por meio de seleção de genitores ISSR-divergentes. *Ciência Agrônômica*, v.44, n.3, p.578-586, 2013. <<http://dx.doi.org/10.1590/S1806-66902013000300021>>.
- Sebbenn, A. M.; Seoane, C. E. S. Estimativa de tamanho efetivo de endogamia por marcadores genéticos. *Revista Árvore*, v.29, n.1, p.1-7, 2005. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622005000100001>>.
- Souza, G. A.; Carvalho, M. R. O.; Martins, E. R.; Guedes, R. N. C.; Oliveira, L. O. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.43, n.7, p.843-849, 2008. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2008000700008>>.

- Taiz, L.; Zeiger, E. Fisiologia vegetal. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 722p.
- Torezan, J. M. D.; Souza, R. F.; Ruas, P. M.; Ruas, C. F.; Camargo, E. H.; Vanzela, A. L. L. Genetic variability of pré and post-fragmentation cohorts of *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (Apocynaceae). Brazilian Archives of Biology and Technology, v.48, n.2, p.171-180, 2005. <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132005000200002>>.
- Vieira, F. A.; Novaes, R. M. L.; Fajardo, C. G.; Santos, R. M.; Almeida, H. S.; Carvalho, D.; Lovato, M. B. Holocene southward expansion in seasonally dry tropical forests in South America: phylogeography of *Ficus bonijesulapensis* (Moraceae). Botanical Journal of the Linnean Society, v.177, n.2, p.189-201, 2015. <<http://dx.doi.org/10.1111/boj.12241>>.
- Vieira, F.A.; Carvalho, D. Genetic structure of an insect-pollinated and bird-dispersed tropical tree in vegetation fragments and corridors: implications for conservation. Biodiversity and Conservation, v.17, n.10, p.2305-2321, 2008. <<http://dx.doi.org/10.1007/s10531-008-9367-7>>.
- Yeh, F. C.; Yang, R. C.; Boyle, T. B. J.; Ye, Z. H.; Mao, J. X. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Edmonton: Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, 1997.
- Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, v.20, n.2, p.176-183, 1994. <<http://dx.doi.org/10.1006/geno.1994.1151>>.