

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**MANEJO DO JENIPEIRO (*Genipa americana* L.) PARA PRODUÇÃO DE
MADEIRA E AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA POR MEIO DE
MARCADORES MOLECULARES, CRUZ DAS ALMAS-BAHIA**

PEDRO DE ALMEIDA SANTOS

CRUZ DAS ALMAS-BAHIA
AGOSTO – 2012

**MANEJO DO JENIPAPEIRO (*Genipa americana* L.) PARA PRODUÇÃO DE
MADEIRA E AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA POR MEIO DE
MARCADORES MOLECULARES, CRUZ DAS ALMAS-BAHIA**

PEDRO DE ALMEIDA SANTOS

Engenheiro Agrônomo
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), 2009

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. DEOCLIDES RICARDO DE SOUZA

Co-orientadora: Profa. Dra. SIMONE ALVES SILVA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA – 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

S237 Santos, Pedro de Almeida.

Manejo do jenipapeiro (*Genipa americana* L.) para produção de madeira e avaliação da diversidade genética por meio de marcadores moleculares, Cruz das Almas-Bahia / Pedro de Almeida Santos._ Cruz das Almas, BA, 2012.
40f.; il.

Orientador: Deoclides Ricardo de Souza.

Coorientadora: Simone Alves Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Jenipapo – Aspectos genéticos. 2.Madeira – Uso.
I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD: 634.6

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
PEDRO DE ALMEIDA SANTOS**

Prof. Dr. Deoclides Ricardo Souza
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
(Orientador)

Profa. Dra. Edna Lobo Machado
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB



Prof. Dr. Alessandro de Paula
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais em Conferindo o grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais em

DEDICATÓRIA

Dedico integralmente a Deus e a santa intercessora Nossa Senhora das Graças da Medalha Milagrosa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por ter nascido vivo, sem defeitos físicos nem mentais e ter tido a oportunidade de estudar e ter chegado até aqui.

Aos meus familiares, especialmente minha esposa Maria da Glória e meus queridos filhos Glória Fernanda e Pedro Robson, pelo companheirismo, compreensão, estímulo, dedicação e, principalmente, pelos sacrifícios que foram obrigados a fazer por esta causa.

Aos colegas e amigos, Bruno Portela Brasileiro e Orlando Sampaio Filho, por terem feito nascer em mim o desejo de fazer Pós-graduação, além de incentivarem a minha participação em pesquisas, cursos e eventos científicos que me qualificassem para as atividades de pesquisa. Preparação que foi muito importante para a execução deste trabalho.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais e ao seu corpo docente, pela oportunidade de realização do curso.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Deoclides Ricardo de Souza, pela orientação, dedicação, amizade, paciência e confiança na realização deste trabalho.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Simone Alves Silva, pela co-orientação, amizade, confiança e por permitir a realização de parte deste trabalho no Laboratório do Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia (NBIO).

Ao Dr. Eder Jorge pelos ensinamentos e gentileza em ceder amostras dos marcadores moleculares do tipo ISSR para testes preliminares em jenipapeiro.

À Professora Dra. Edna Lobo pela amizade, ensinamentos, dicas e esclarecimentos que muito contribuíram para a concretização deste trabalho.

Ao amigo Paulo Henrique pela amizade, companheirismo, paciência e dedicação nos ensinamentos das práticas laboratoriais de marcadores moleculares.

Aos colegas do Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia (NBIO), em especial ao colega e amigo Helison Brasileiro, encarregado do laboratório, pela sua inestimável ajuda, empenho e dedicação na realização das reações e coletas de dados moleculares. Auxílio, sem o qual não seria possível a concretização deste trabalho.

Ao engenheiro florestal Admilson, bem como aos acadêmicos do Curso de Engenharia Florestal Gleidson, Geisa Nascimento, Augusto e Diego Wesley, pela colaboração nos trabalhos de campo.

Aos Professores Dra. Maria Angélica e Dr. Carlos Ledo pelos ensinamentos, atenção, amizade e apoio.

Às amigas e anjos da guarda Jacqueline, Rafaela e Vanessa pelas análises, dicas, apoio e força na hora do sufoco.

À coordenação da Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pelo apoio e compreensão com as dificuldades de um aluno não bolsista.

Ao Banco do Nordeste Brasileiro (BNB) pelo apoio financeiro, fundamentais para execução deste trabalho.

Aos membros da banca avaliadora pelas preciosas correções, dicas e contribuições.

Finalmente, agradeço aos amigos e colegas injustiçados pela falha de memória.

Muito obrigado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	1
Capítulo 1	
MANEJO DO JENIPEIRO (<i>Genipa americana</i> L) PARA PRODUÇÃO MADEIREIRA, SOB DIFERENTES ESPAÇAMENTOS.....	10
Capítulo 2	
ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM JENIPEIRO (<i>Genipa americana</i> L.) POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES ISSR, VISANDO A CONSERVAÇÃO E MANEJO DA ESPÉCIE.....	20
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40

MANEJO DO JENIPAPEIRO (*Genipa americana* L.) PARA PRODUÇÃO DE MADEIRA E AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES, CRUZ DAS ALMAS-BAHIA

Autor: Pedro de Almeida Santos

Orientador: Prof. Dr. Deoclides Ricardo de Souza

Co-orientadora: Profa. Dra. Simone Alves Silva

RESUMO: O trabalho teve como objetivos avaliar o crescimento e produção inicial do jenipapeiro (*Genipa americana* L.) sob diferentes espaçamentos e avaliar a diversidade genética de 35 acessos, utilizando marcadores moleculares do tipo ISSR. Instalou-se o experimento no Campus experimental da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. O delineamento foi em blocos casualizados com cinco tratamentos (3,0 x 1,5 m; 3,0 x 2,0 m; 3,0 x 2,5 m; 3,0 x 3,0 m e 3,0 x 3,5 m) e quatro repetições, no esquema de parcela subdividida, com as parcelas constituídas por 25 plantas. Aos 12, 24 e 36 meses, avaliou-se a sobrevivência, a altura, o diâmetro quadrático ao nível do solo e a área basal por hectare da planta. Aos 36 meses, a sobrevivência média foi de 77,93% e os tratamentos apresentaram diferenças significativas ($p < 0,01$) para área basal, mas não influenciaram no crescimento em altura e diâmetro. A *G. americana* apresenta potencial de crescimento, produção e adaptação ecológica nas condições edafoclimáticas de cultivo. Para o estudo da diversidade genética, utilizou-se 22 iniciadores ISSR em DNA genômico de 35 acessos de Jenipapeiro. Dos 22 iniciadores, 19 produziram 91 fragmentos polimórficos que foram transformados em matriz binária de presença (1) e ausência (0). A diversidade genética foi avaliada por matriz gerada pelo complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard e pelo dendrograma resultante da análise de agrupamento UPGMA. Formaram-se três grupos distintos, mostrando que há diversidade genética entre os acessos. A distância genética entre os acessos variou de 0,14 a 1,00. Os marcadores moleculares do tipo ISSR mostram-se eficientes na caracterização da variabilidade genética existente entre os acessos de jenipapeiro.

Palavras chaves: Sobrevivência, área basal, DNA, polimorfismo, dendrograma.

MANAGEMENT OF GENIPAP (*Genipa americana* L.) FOR WOOD PRODUCTION AND EVALUATION OF THE GENETIC DIVERSITY THROUGH MOLECULAR MARKERS, CRUZ DAS ALMAS-BAHIA

Author: Pedro de Almeida Santos

Advisor: Prof. Dr. Deoclides Ricardo de Souza

Co-advisor: Profa. Dra. Simone Alves Silva

ABSTRACT: The study aimed to evaluate the growth and initial production of genipap (*G. americana* L.) under different spacings and investigate the genetic diversity of 35 accesses by using ISSR molecular markers. The experiment was installed at the Experimental Campus of Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. It was used a randomized blocks design with five treatments (3.0 x 1.5 m; 3.0 x 2.0 m; 3.0 x 2.5 m; 3.0 x 3.0 m e 3.0 x 3.5 m) and four repetitions, in a split plot scheme, with its plots constituted of 25 plants. At 12, 24 and 36 months-old, it was evaluated the survival, the height, the quadratic diameter at ground level and basal area per plant hectare. At 36 months-old, the average survival was of 77.93% and the treatments showed significant differences ($p < 0,01$) for basal area, but did not influence the height and diameter growths. The *G. americana* presents potentials of growth, production and ecological adaptation under the soil and climate conditions of cultivation. For the investigation of the genetic diversity, it was used 22 ISSR initiators in genomic DNA of 35 accesses of Genipap. From those 22 initiators, 19 generated 91 polymorphic fragments that were turned into a binary matrix of presence (1) and of absence (0). The genetic diversity was evaluated by a matrix created from the complement of the Jaccard's similarity coefficient and by the resulting dendrogram of the UPGMA grouping analysis. It was formed three different groups, showing that there is genetic diversity among the accesses. The genetic distance among the accesses varied from 0.14 to 1.00. The ISSR molecular markers have showed to be efficient for fingerprinting of the genetic variability existing among the genipap accesses.

Keywords: Survival, basal area, conservation, polymorphism.

INTRODUÇÃO

A expansão das fronteiras agrícolas e pecuárias, o crescimento urbano e a exploração irracional dos recursos madeireiros nativos das florestas tropicais têm levado à extinção diversas espécies arbóreas de valores ecológico e econômico. Situação semelhante está ocorrendo com o jenipapeiro que tem sofrido progressiva redução do número de indivíduos e, conseqüentemente, a variabilidade genética da espécie.

O jenipapeiro é uma planta heliófita, semidecídua, seletiva, característica das florestas pluviais situadas em várzeas úmidas e brejosas (LORENZI, 2002). Apresenta crescimento moderado, com distribuição geográfica desde a latitude 20°N, no sul do México, até a latitude 22°47', no noroeste do Estado do Paraná no Brasil (CARVALHO, 2003).

No Brasil, a espécie *Genipa americana* L. ocorre de forma natural nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e também na região Sul, com ocorrência apenas no extremo noroeste do Estado do Paraná. Nestas regiões, o jenipapeiro vegeta nos biomas de Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Pantanal, preferencialmente, em formações secundárias desses (CARVALHO, 2003).

No Estado da Bahia, a ocorrência da *G. americana* é ampla, sendo comum encontrá-la em várias regiões, biomas e formações florestais, com destaque para a região do Recôncavo, onde seus frutos são amplamente utilizados na forma de doce, suco, geleia e licor (SOUSA et al., 2007).

A *Genipa americana* caracteriza-se pela sua capacidade de desenvolver-se bem em solos relativamente pobres, ter preferência por terrenos úmidos, encharcados ou inundáveis, apresentar fuste reto com poucas ramificações, ter alto índice de desrama natural e ser sempreflorens (produz frutos o ano inteiro) (CARVALHO, 2003; SEAGRI-BA, 2012).

A madeira apresenta densidade média de 0,68 gr/cm³, sendo considerada moderadamente pesada, flexível, compacta, fácil de trabalhar e de longa durabilidade. Pode ser empregada na construção civil e naval, marcenaria e carpintaria em geral para a fabricação de móveis, coronha de armas de fogo, cabos de ferramentas e batentes de portas e janelas (LORENZI, 2002).

Apesar da ampla distribuição geográfica e vegetativa, do potencial de uso do jenipapeiro, pouca informação se tem sobre sua ecologia, domesticação, silvicultura e genética.

Do ponto de vista ecológico, a espécie *G. americana* é reconhecida como indicadora da presença de água no solo, visto que, por ser hidrófila, tem preferência por solos periodicamente inundados como florestas pluviais e várzeas brejosas (LORENZI, 2002; CARVALHO, 2003). Estudos mais recentes coloca o jenipapeiro como espécie de grande potencial para ser utilizada em programas de fitorremediação em solos contaminados por cromo nas suas formas Cr^{+6} e Cr^{+3} , mediante utilização dos mecanismos de rizofiltração e fitoestabilização (SANTANA et al., 2012).

Quanto ao processo de domesticação, a maioria das pesquisas com o jenipapeiro está voltada para avaliar a espécie como produtora de frutos e a qualidade química e organoléptica dos mesmos (HANSEN, 2006; SOUZA et al., 2007), avaliar o potencial de germinação das sementes e enxertia (PRADO NETO, 2006) e multiplicação *in vitro* (ROCHA, 2006).

No aspecto silvicultural, os experimentos com o jenipapeiro concentram-se na avaliação da sobrevivência em diferentes ambientes e condições edafoclimáticas (SAMPAIO e PINTO, 2007; ANTEZANA, 2008; SILVA e CORREIA, 2008), onde se verificou altas taxas para diferentes períodos de avaliação. Sampaio e Pinto (2007), Antezana (2008) observaram 100% de sobrevivência de *G. americana* em áreas degradadas do cerrado, respectivamente, aos nove e 12 meses após plantio. Em áreas degradadas de mineração no cerrado obteve-se 96,7% de sobrevivência aos 18 meses após o plantio (SILVA e CORREA, 2008).

Embora seja conhecido o potencial do jenipapeiro para a produção de madeira de boa qualidade, não há relatos de ensaios de espaçamentos com a espécie. Segundo Castro (2008), a escolha do espaçamento de plantio vai interferir na taxa de sobrevivência, na taxa de crescimento das plantas, na qualidade da madeira, na idade de corte e nos custos de produção. Leite et al.(2006) afirmam que as diferenças de espaçamentos refletem diretamente sobre as médias de altura total e de diâmetro.

O conhecimento dos padrões de variabilidade genética e sua distribuição nas populações de jenipapeiro ainda são considerados escassos e insipientes

para subsidiar um programa de conservação e manejo da espécie. Na literatura, poucos são os trabalhos versando sobre o tema e, na maioria das vezes, as pesquisas têm sido centradas na caracterização morfológica de frutos (SANTOS, 2007; HANSEN et al. 2007), das árvores (HANSEN et al. 2007; SOUZA, 2009). Nestes estudos detectou-se grande variabilidade dentro e entre populações de jenipapeiro do Recôncavo.

No campo da biotecnologia, o jenipapeiro já teve sua variabilidade aferida por eletroforese de isoenzimas em população natural da Estação Ecológica de Moji Guaçu/SP (SEBBENN et al. 1998, 2003) tendo os autores constatado a existência de grande variabilidade genética na população estudada. Os marcadores moleculares do tipo RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) também foram utilizados para acessar a variabilidade genética da espécie em populações naturais do Recôncavo da Bahia (HANSEN, 2006) e do Baixo São Francisco Sergipano (SANTOS, 2007), tendo sido evidenciado, também, a ocorrência de grande variabilidade genética na espécie.

A escassez de informações sobre a variabilidade genética do jenipapeiro, tanto a nível fenotípico como em nível de DNA, assinalam para a necessidade de se aprofundar estudos para a caracterização molecular da variabilidade genética da espécie, objetivando a elaboração de estratégias para conservação e manejo.

Segundo Frankel et al. (1995), o conhecimento da variabilidade genética de uma população é informação valiosa que poderá ajudar na elaboração de estratégia de conservação e manejo da espécie.

O conhecimento da diversidade genética pode ser obtido através de descritores morfológicos, agronômicos ou moleculares. Os morfológicos e agronômicos têm como limitantes o ambiente e o estágio vegetativo da planta (FERREIRA e GATTAPAGLIA, 1998; PASQUAL et al., 2008). Por outro lado, os marcadores moleculares têm se revelado como ferramenta útil para acessar informações diretamente do genoma de cada espécie. Essas ferramentas permitem analisar as variações genômicas das espécies vegetais, bem como a dinâmica da variabilidade genética entre e dentro de populações naturais (BORNET e BRANCHARD, 2001; GUO et al., 2009; REDDY et al., 2002; PADMESH et al., 2006; SOUZA et al., 2008; CAIXETA et al., 2009; PEREIRA et al., 2009). Dentre as vantagens que apresentam está o fato de não serem

influenciados pelo ambiente e serem detectáveis em todos os estádios de desenvolvimento da planta.

Dentre os tipos de marcadores moleculares baseados na técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), o ISSR (*Inter simple sequence repeat*) tem sido usado nas análises de divergência genética por apresentar custos baixos, rapidez de acesso a variabilidade ao nível do DNA e potencial de repetibilidade nas análises intraespecíficas (WILLIAMS et al., 1990; BORNET e BRANCHARD, 2001; REDDY et al., 2002; PADMESH et al., 2006; CAIXETA et al., 2009).

O marcador ISSR permite amplificação de regiões do genoma que podem ser transcritas, bem como regiões não codificantes (ZIETKIEWICZ et al., 1994; REDDY et al., 2002; LIU et al., 2012). Isso é importante na avaliação da variação do genoma de uma espécie (WILLIAMS et al., 1990; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; ZIETKIEWICZ et al., 1994).

Vários estudos têm apresentado alto conteúdo de informação genética revelado por marcadores ISSR que parecem ser especialmente apropriados para estudos filogenéticos, avaliação da diversidade genética e identificação de cultivares (RAKOCZY-TROJANOWSKA e BOLOBOK, 2004).

O estudo aqui apresentado foi conduzido por meio de marcadores ISSR (*Inter simple sequence repeat*) que, embora sejam reconhecidos como dominantes e menos polimórficos que os marcadores SSR, foram escolhidos por ser um marcador baseado em microssatélites que utiliza um único primer com 16-20 pb e produz grandes fragmentos de DNA (100 a 3000 pb) altamente polimórficos. Esses marcadores moleculares, além de não necessitar de conhecimento prévio do genoma da espécie, requer pouca infraestrutura laboratorial para execução dos experimentos.

Este trabalho teve por objetivos: 1 - avaliar o crescimento e produção inicial da *Genipa americana* sob diferentes espaçamentos; 2 - avaliar a diversidade genética de 35 acessos de jenipapeiros por meio de marcadores moleculares do tipo ISSR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTEZANA, F. L. **Crescimento inicial de 15 espécies nativas do Bioma Cerrado sob diferentes condições de adubação e roçagem, em Planaltina –**

DF. 2008. 84 f. Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Florestal, Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonancorede inter simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and SPECIFIC TOOLS FOR Genome Fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, Canada, v. 19, n. 3, p. 209-215, 2001.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed) **Marcadores Moleculares**. Viçosa, v. 1, p. 11-94, 2009.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, 1039 p, 2003.

CASTRO, A. W. V.; FARIAS NETO, J. T.; CAVALCANTE, E. S. Efeito do espaçamento na produtividade de biomassa de taxi-branco (*Sclerolobium paniculatum* Vogel). **Acta amazônica**, Manaus, v. 28, n.2, p. 141-146, 2008.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 3.Ed. 220 p. 1998.

FRANKEL, O. H.; BROWN, A. H. D.; BURDON, J. J. **The conservation of plant biodiversity**. Cambridge: Cambridge University Press, 299p. 1995..

GUO,H. B.; HUANG, K. Y.; ZHOU, T. S.; WU, Q. H.; ZHANG, Y. J.; LIANG, Z. S. DNA isolation, optimization of ISSR-PCR system and primers screening of *Scutellaria baicalensis*. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nairobi, v. 3, n. 11, p. 898-901, 2009.

HANSEN, D. S. **Avaliação de genótipos de jenipapeiro utilizando marcadores agronômicos e RAPD**. UFBA. 77 p. Cruz das Almas, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias. Área de concentração Fitotecnia).

HANSEN, D. S. ; SILVA, S. A. ; FONSECA, A. A. O. ; SALDANHA, R. B. ; SILVA, S. M. P. C. ; GARCIA, F. R. Jenipapeiros nativos do Recôncavo Baiano : dissimilaridade e caracterização física dos Frutos. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, n. 4. p. 365-372, 2007.

LEITE, G. H.; NOGUEIRA, G. S.; MOREIRA, A. M. Efeito do espaçamento e da idade sobre variáveis de povoamentos de *Pinus Taeda* L. **Revista Arvore**, Viçosa, v. 30, n. 4, p. 603-612, 2006.

LIU, B.; SUN, X.; WANG, Y.; LI, Y.; CHENG, H.; XIONG, C.; WANG, P. Genetic diversity and molecular discrimination of wild tea plants from Yunnan Province based on inter-simple sequence repeats (ISSR) markers. **African Journal of Biotechnology**, Nairóbi, v. 11 n. 53, p. 11566-11574, 2012.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. v. 1, 2002.

PADMESH, P.; REJI, J. V.; JINISH DHAR, M.; SEENI, S. Estimation of genetic diversity in varieties of mucuna pruriens using RAPD. **Biologia Plantarum**, v.50, n. 3, p. 367- 372, 2006.

PASQUAL, M.; REZENDE, R. K. S.; VILLA, F.; CHAGAS, E. A. Biotecnologia aplicada ao melhoramento de fruteiras. In: BRUCKNER, C. H. (Ed.). **Fundamentos do melhoramento de Fruteiras**. Viçosa: UFV. p. 117-170, 2008.

PEREIRA, M. G.; PEREIRA, T. N. S.; COSTA, F. R. Marcadores Moleculares no Pré-Melhoramento. In: Aluizio Borém; Eveline Teixeira Caixeta. (Org.). **Marcadores Moleculares**. 2 ed. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, v. 1, p. 103-128, 2009.

PRADO NETO, M. **Germinação de sementes e enxertia de jenipapeiro**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Universidade Federal da Bahia, P.46. 2006.

RAKOCZY-TROJANOWSKA, M.; BOLIBOK, H. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. **Celular and Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 9, p. 221-238, 2004.

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

ROCHA, M. A. C. **Morfogênese in vitro em jenipapeiro (*Genipa americana* L.)**. UFBA, 67 p. Cruz das Almas, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência Agrárias. Area de concentração Fitotecnia).

SAMPAIO, J. C; PINTO, J. R. R. Critérios para Avaliação do Desempenho de espécies nativas lenhosas em plantios de restauração no cerrado. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 270-272, 2007.

SANTANA, K. B.; ALMEIDA, A. A. F.; SOUZA, V. L.; MANGABEIRA, P. A. O.; SILVA, D. C.; GOMES, F. P. ; DUTRUCHB, L.; LOGOERCIO, L. L. Physiological analyses of *Genipa americana* L. reveals a tree with ability as phytostabilizer and rhizofilterer of chromium ions for phytoremediation of polluted watersheds. **Environmental and Experimental Botany**. V. 35, p. 35-42, 2012.

SANTOS, R. O. S. ; DANTAS, A. C. V. L. ; FONSECA, A. A. O. ; SILVA, S. A. ; LORDELO, L. S. ; SANROS, K. V. Dispersão da variabilidade fenotípica de jenipapeiros de Cruz das Almas, Bahia. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, n. 4. p. 337-345, 2007.

SEAGRI, Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária. **Cultura Jenipapo**. Disponível em www.seagri.ba.gov.br/jenipapo.htm. Acesso em 22 de maio 2012.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, R. Variabilidade genética, sistema reprodutivo e estrutura genética especial em *Genipa americana* L. através de marcadores isoenzimáticos. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 53, p. 15-30, 1998.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, R. Conservação genética *in situ* e número de matrizes para a coleta de sementes em população de *Genipa americana* L.. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 63, p. 13-22, 2003.

SILVA, L. C. R; CORREA, R. S. Sobrevivência e crescimento de seis espécies arbóreas submetidas a quatro tratamentos em área minerada no cerrado. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 4, 2008.

SOUZA, C. S. **Dissimilaridade de jenipapeiros procedentes de quatro regiões do Recôncavo Baiano**. UFRB. 69 p. Cruz das Almas, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias. Área de concentração Fitotecnia).

SOUZA, C. S; ALVES, S. A; HANSEN, D. S; FONSECA, A. A. O. Correlações entre Caracteres Físicos e Químicos de Jenipapeiros Nativos do Recôncavo Baiano. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 270-272, 2007.

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**, Brasília, v. 43, n. 7, p. 843-849, 2008.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; RAFASLKI, J. A; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, 20 p. 176-183,1994.

CAPÍTULO 1

MANEJO DO JENIPAPEIRO (*Genipa americana* L.) PARA PRODUÇÃO MADEIREIRA SOB DIFERENTES ESPAÇAMENTOS

MANEJO DO JENIPAPEIRO (*Genipa americana* L.) PARA PRODUÇÃO MADEIREIRA SOB DIFERENTES ESPAÇAMENTOS.

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento e a produção inicial da *Genipa americana* L. sob diferentes espaçamentos. A pesquisa foi realizada no Campus Experimental da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas, Bahia: (Latitude: 12°40'39"S, Longitude: 39°06'23"W e Altitude: 220m). Utilizou-se o delineamento estatístico de blocos casualizados com cinco tratamentos (3,0 x 1,5 m; 3,0 x 2,0 m; 3,0 x 2,5 m; 3,0 x 3,0 m e 3,0 x 3,5 m) e quatro repetições, no esquema de parcela subdividida. Cada parcela foi constituída de 25 plantas mensuráveis. Aos 12, 24 e 36 meses, avaliou-se a sobrevivência, o diâmetro quadrático ao nível do solo, a altura total e a área basal por hectare das plantas. A taxa de sobrevivência média foi de 77,93% aos 36 meses. Os tratamentos apresentaram diferenças significativas ($p < 0,01$) para área basal por hectare, porém as plantas na fase inicial ainda não estabeleceram competição pelos fatores edafocológicos. Os espaçamentos não influenciaram no crescimento em diâmetro e altura da espécie aos 36 meses. A *G. americana* apresenta potencial de crescimento, produção e adaptação ecológica nas condições edafoclimáticas de cultivo.

Palavras chave: Sobrevivência, crescimento, área basal.

MANAGEMENT OF GENIPAP (*Genipa americana* L.) WOOD FOR PRODUCTION UNDER DIFFERENT SPACINGS

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the growth and initial production of *G. americana* L. under different spacings. The research was conducted at the Experimental Campus of the Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas, Bahia: (Latitude: 12°40'39"S, Longitude: 39°06'23"W, Altitude: 220m). We used the statistical design of randomized blocks with five treatments (3.0 x 1.5 m, 3.0 x 2.0 m, 3.0 x 2.5 m, 3.0 x 3.0 m and 3.0 x 3.5 m) and four repeats in a split plot design. Each plot consists of 25 measurable plants. At 12, 24 and 36 months it was evaluated the survival, the quadratic mean diameter at ground level, the total height and the basal area per hectare of plants. The average survival rate was 77.93% at 36 months. The treatments showed significant differences ($p < 0.01$) for basal area per hectare, but the young plants have not yet established competition for the soil and ecological factors. The spacings had no influence on the growth of diameter and height of the species at 36 months. The *G. americana* presents potential of growth, production and ecological adaptation under the edafoclimatic conditions of cultivation.

Keywords: Survival, growth, basal area.

INTRODUÇÃO

O jenipapeiro é uma planta bastante conhecida pelos agricultores familiares do recôncavo baiano. Porém, o uso desta espécie pelos agricultores para diversas finalidades ainda é de forma extrativista (SOUZA et al., 2007). A prática corrente é de preservar as árvores que produzam bons frutos e as que não servem para essa finalidade são transformadas em madeira para diversos usos no mercado madeireiro clandestino. Esta prática tem reduzido o número de indivíduos, e conseqüentemente a variabilidade genética dessa espécie, colocando-a em risco.

Considerando a importância socioeconômica e o potencial madeireiro e não madeireiro da espécie para a região, o manejo dessa planta é importante quando se deseja maior produtividade e qualidade das árvores. A carência de informações sobre os aspectos ecológicos, silviculturais e genético da espécie, urge a necessidade de trabalhos científicos que gerem conhecimentos que viabilizem programas de conservação, de manejo e de melhoramento genético, visando à sustentabilidade da espécie.

Outro aspecto relevante em espécies pouco estudadas como o jenipapeiro é a condução em plantios homogêneos sob diferentes espaçamentos, visando à implantação de programas silviculturais e ecológicos. A definição de espaçamento é determinante no desenvolvimento de espécies florestais, pois o uso incorreto pode influenciar no crescimento e na produtividade dos povoamentos florestais (RONDON, 2002; OLIVEIRA NETO et al., 2003; LEITE et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2008; AOKI e ZIMBACK, 2010; OLIVEIRA NETO et al., 2010). A densidade ideal de plantio para a obtenção de produtos florestais é aquela que não afeta o crescimento e a produção do povoamento (WILL et al., 2001). Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento e produção inicial da *Genipa americana*, sob diferentes espaçamentos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi implantado em junho de 2009 no Campus Experimental da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas, Bahia (39°06'23" Sul e 12°40'39" Oeste, com altitude de 226 metros). Segundo

classificação de Köppen, o clima é do tipo tropical quente e úmido. A precipitação média é de 1.224 mm/ano, a temperatura média anual de 24,5°C e a umidade relativa do ar de aproximadamente 82%. O solo é do tipo latossolo amarelo distrófico com baixos pH e CTC (SOARES FILHO et al., 2008).

O delineamento estatístico foi em blocos casualizados com cinco tratamentos (espaçamentos) e quatro repetições, no esquema de parcelas subdivididas no tempo (idade). Cada parcela consistiu-se de 25 plantas (5 x 5) dispostas em cinco linhas com cinco plantas cada. Os dados de sobrevivência (SBV), diâmetro quadrático ao nível do solo (DAS) e altura total (Ht) foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

As sementes de jenipapeiro foram coletadas em árvores distribuídas no município de Cruz das Almas.

As mudas de jenipapeiro foram produzidas no viveiro do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB) da UFRB pelo método de semeadura direta em sacolas plásticas com dimensões de 15 x 28 cm. O substrato utilizado foi uma mistura de terra vegetal (80%), esterco de curral (20%), NPK 4-14-8 (4,5kg) por metro cúbico do composto.

No viveiro, a adubação foliar foi aplicada numa proporção de 60 g de uréia e 30 g de cloreto de potássio quinze dias após emergência, sendo a primeira aplicação conjunta e as demais alternadas quinzenalmente.

As mudas com altura entre 25 e 30 cm foram plantadas em covas de 0,30 x 0,30 x 0,30 m nos espaçamentos: 3,0 x 1,5 m; 3,0 x 2,0 m; 3,0 x 2,5 m; 3,0 x 3,0 m e 3,0 x 3,5 m. Simultaneamente, realizou-se a adubação de fundação em cada cova com 120 g de superfosfato simples.

A primeira adubação de cobertura foi aos 90 dias após o plantio com a aplicação de 120 g de NPK 20-0-20 por planta, sendo repetida no início de cada estação chuvosa.

Os tratos culturais contemplaram roçagem mecanizada nas entre linhas de plantio e capina manual nas linhas de plantio, três vezes ao ano, para diminuição da matocompetição.

O monitoramento e controle de formigas foram feitos periodicamente na área e com eventual aplicação de formicida granulado.

O diâmetro ao nível do solo (DAS) e altura total (Ht) das 25 plantas em cada parcela foram obtidos aos 12, 24 e 36 meses. Na medição do DAS, em centímetros, utilizou-se paquímetro digital e da Ht, em metros, trena metálica graduada. A Ht foi medida da base do coleto até a inserção da dominância apical.

A sobrevivência foi obtida pela contagem do número de plantas vivas em cada tratamento e convertida em porcentagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores dos quadrados médios da sobrevivência, diâmetro quadrático ao nível do solo, altura total e área basal por hectare da *G. americana* estão apresentados na Tabela 1. Observam-se valores médios significativos ($P < 0,01$) entre os períodos avaliados (12, 24 e 36 meses) para todas as variáveis analisadas. A sobrevivência teve a interação espaçamento x idade significativa (Tabela 1). Apesar dos tratamentos apresentarem diferenças significativas ($P < 0,01$) para a área basal por hectare, as plantas jovens ainda não estabeleceram competição pelos fatores edafocológicos.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para as variáveis sobrevivência (SBV), diâmetro quadrático ao nível do solo (DAS), altura total (Ht) e área basal por hectare da *G. americana* cultivada sob diferentes espaçamentos, Campus Experimental da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, 2012.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio			
		SBV (%)	DAS (cm)	Ht (m)	AB (m ² /ha)
Bloco	3				
Espaçamento	4	287,60000 ^{ns}	0,2001 ^{ns}	0,0289 ^{ns}	0,002723**
Resíduo (a)	12	256,311111	0,2259	0,0405	0,000189
Idade	2	6,666667**	13,2378**	2,8951**	0,008488**
Espaçamento x Idade	8	4,000000**	0,0206 ^{ns}	0,0074 ^{ns}	0,000233**
Resíduo (b)	30	0,977778	0,0203	0,0050	0,000031
CV parcela		20,54	16,46	21,95	33,77
CV subparcela		1,27	4,93	7,68	13,75
Média		77,93	2,89	0,92	0,040697

**e* significativo a 1 e 5% , respectivamente. ^{ns} não significativo a 5%

Aoki e Zimback (2010), Leite et al. (2006) e Schneider et al. (2000) observaram que as diferenças estatísticas para altura total e diâmetro sob diferentes espaçamentos são mais acentuadas com aumento da idade, devido à maior competitividade pelos fatores edafocológicos entre as plantas.

As médias da sobrevivência, diâmetro quadrático ao nível do solo, altura total e área basal por hectare das plantas estão apresentadas na Tabela 2. Verifica-se diferença significativa nas variáveis analisadas. Observa-se que a idade influenciou no crescimento em diâmetro quadrático, altura total e área basal das plantas, apresentando maiores valores médios aos 36 meses. Isso indica que a espécie apresenta maiores incrementos das plantas com aumento da idade nas condições edafocológicas de cultivo.

Tabela 2. Médias da sobrevivência (SBV), diâmetro quadrático ao nível do solo (DAS), altura total (Ht) e área basal (AB) da *G. americana* por idade, Campus Experimental da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, 2012.

Idade (mês)	Sobrevivência (%)	Diâmetro (cm)	Altura total (m)	Área basal (m ² /ha)
12	78,60 a	1,98 c	0,51 c	0,0182 c
24	77,60 b	3,13 b	0,97 b	0,0451 b
36	77,60 b	3,55 a	1,27 a	0,0587 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Na Tabela 3, observam-se as médias da sobrevivência e área basal das plantas da *G. americana*. As médias de sobrevivência diferem entre si para o espaçamento 3,0 x 2,5m aos 24 meses. Apesar do espaçamento 3,0 x 1,5m apresentar menor taxa de sobrevivência média, a área basal foi superior nos períodos avaliados. Isso se deve ao predomínio de indivíduos com maiores diâmetros quadráticos ao nível do solo.

A sobrevivência média da *G. americana* foi de 77,93% aos 36 meses, indicando bom estabelecimento das mudas no campo. Isso mostrou que a espécie tenha encontrado condições favoráveis para expressar o seu potencial de adaptação ecológica nas condições edafocológicas de cultivo. A capacidade de estabelecimento de espécies florestais no campo avaliada pela sobrevivência,

expressa fenotipicamente o potencial de adaptação ecológica e vigor das plantas (MACEDO et al., 2002 e 2005).

Tabela 3. Médias da sobrevivência (SBV) e área basal da *G. americana* por tratamento e por idade no Campus Experimental da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, 2012.

Espaçamento	Sobrevivência (%)			Área basal (m ² /ha)		
	12 meses	24 meses	36 meses	12 meses	24 meses	36 meses
3,0 x 1,5 m	72 aA	72 aA	72 aA	0,029075 aA	0,065500 aB	0,089975 aC
3,0 x 2,0 m	85 aA	85 aA	85 aA	0,022050 abA	0,058400 aB	0,073700 bC
3,0 x 2,5 m	82 aA	78 aB	78 aB	0,014726 bA	0,036850 bB	0,045825 cB
3,0 x 3,0 m	75 aA	75 aA	75 aA	0,013850 bA	0,036150 bB	0,047000 cC
3,0 x 3,5 m	79 aA	78 aA	78 aA	0,011475 bA	0,028825 bB	0,037050 cB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

CONCLUSÕES

Os espaçamentos não influenciaram no crescimento em diâmetro e altura da espécie *G. americana* aos 36 meses.

A *G. americana* apresenta potencial de crescimento, produção e adaptação ecológica nas condições edafoclimáticas de cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOKI, H.; ZIMBACK, L. influência do espaçamento na conformação do fuste, diâmetro à altura do peito e altura do camará - *Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabr. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 22 n. 2 p. 289-295, 2010.

LEITE, G. H.; NOGUEIRA, G. S.; MOREIRA, A. M. Efeito do espaçamento e da idade sobre variáveis de povoamentos de *Pinus Taeda* L. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 4, p.603-612, 2006.

MACEDO, R. L. G.; GOMES, J. E.; VENTURIN, N.; SALGADO, B. G. Desenvolvimento inicial de *Tectona grandis* L. f. (Teca) em diferentes espaçamentos no município de Paracatu-MG. **Cerne**, Lavras, v.11, n. 1, p. 61-69, 2005.

MACEDO, R. L. G.; VENTURIN, N.; GOMES, J. E.; OLIVEIRA, T. K. Dinâmica de estabelecimento de *Tectona grandis* L. f. (Teca) introduzida em cafezal na região de Lavras-MG. **O Brasil Florestal**, Brasília, n. 73, p. 31-38, 2002.

NOGUEIRA, G. S.; LEITE, H. G.; REIS, G. G.; MOREIRA, A. M. Influência do espaçamento inicial sobre a forma do fuste de árvores de *Pinus taeda* L. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 5, p. 855-860, 2008.

OLIVEIRA NETO, S. N.; REIS, G. G.; REIS, M. G. F.; LEITE, H. G.; NEVES, J. C. L. Crescimento e distribuição diamétrica de *Eucalyptus camaldulensis* em diferentes níveis de adubação na região do Cerrado de Minas Gerais. **Floresta**, Curitiba, v. 40, n. 4, p. 755-762, 2010.

OLIVEIRA NETO, S. N.; REIS, G. G.; REIS, M. G. F.; NEVES, J. C. L. Produção de biomassa em *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. em resposta à adubação e ao espaçamento. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 15-23, 2003.

RONDON, E. V. Produção de biomassa e crescimento de árvores de *Schizolobium amazonicum* (Huber) Ducke sob diferentes espaçamentos na Região da Mata. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 5, p. 573-576, 2002.

SCHNEIDER, P. R.; FLEIG, F. D.; FINGER, C. A. G.; MAYER, J. E. K. Crescimento da acácia-negra, *Acacia mearnsii* De Wild em diferentes espaçamentos. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 10, n. 2, p. 101-112, 2000.

SOARES FILHO, W. S.; LEDO, C. A. S.; PASSOS, O. S.; SOUZA, A. S.; MATTOS, L. A.; QUINTELA, M. P. Parentais femininos monoembriônicos na

obtenção de porta enxertos híbridos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 215-218, 2008.

SOUZA, C. S.; ALVES, S. A.; HANSEN, D. S.; FONSECA, A. A. O. Correlações entre Caracteres Físicos e Químicos de Jenipapeiros Nativos do Recôncavo Baiano. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 270-272, 2007.

WILL, R. E.; BARRON, G. A.; BURKES, E. C.; SHIVER, B.; TESKEY, R. O. Relationship between intercepted radiation, net photosynthesis, respiration, and rate of stem volume growth of *Pinus taeda* and *Pinus elliottii* stands of different densities. **Forest Ecology and Management**, v. 154, p. 155-163, 2001.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM JENIPAPEIRO (*Genipa americana* L.) POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES ISSR, VISANDO A CONSERVAÇÃO E MANEJO DA ESPÉCIE

ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM JENIPAPEIRO (*Genipa americana* L.) POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES ISSR, VISANDO A CONSERVAÇÃO E MANEJO DA ESPÉCIE

RESUMO: O presente trabalho teve por objetivos avaliar, por meio de marcadores moleculares do tipo ISSR, a diversidade genética entre 35 acessos de jenipapeiro de plantio implantado no Campus Experimental da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, em Cruz das Almas, com sementes de árvores deste município. Para o estudo, extraiu-se o DNA genômico de tecido foliar de 35 acessos de *Genipa americana* L. pelo método CTAB modificado. Foram utilizados 22 oligonucleotídeos ISSR como iniciadores na reação em cadeia da Polimerase (PCR). Dos 22 iniciadores, 19 produziram fragmentos polimórficos que foram transformados em matriz binária de presença (1) e ausência (0). A diversidade genética foi avaliada por matriz gerada pelo complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard e pelo dendrograma resultante da análise de agrupamento UPGMA. Foram formados três grupos distintos, que foram validados pela análise discriminante. Os grupos formados apresentaram diversidade genética, onde a distância genética entre os acessos variou de 0,14 a 1,00. Este estudo revelou a existência de variabilidade entre os acessos de jenipapeiro e mostrou que os marcadores moleculares do tipo ISSR são ferramentas eficientes na detecção de variação no genoma da espécie, importante para sua conservação e manejo.

Palavras chave: DNA genômico, tecido foliar, CTAB.

STUDY OF GENETIC DIVERSITY IN GENIPAP (*Genipa americana* L.) THROUGH ISSR MOLECULAR MARKERS AIMING THE CONSERVATION AND MANAGEMENT OF THE SPECIES

ABSTRACT: The present work had the objectives of evaluate, through ISSR molecular markers, the genetic divergence among 35 accesses of genipap in a plantation implanted in the experimental field of Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, in Cruz das Almas, using seeds of the trees of this town. For this study, it was extracted the genomic DNA of leaf tissue of 35 accesses of *Genipa americana* L. through the modified CTAB method. It was utilized 22 oligonucleotides ISSR as polymerase chain reaction (PCR) initiators. From the 22 initiators, 19 generated 91 polymorphic fragments that were turned into a binary matrix of presence (1) and of absence (0).). The genetic diversity was evaluated by a matrix created from the complement of the Jaccard's similarity coefficient and by the resulting dendrogram of the UPGMA grouping analysis. . It was formed three different groups that were validated by the discriminant analysis. The formed groups presented genetic diversity, in which the genetic distance among the accesses varied from 0.14 to 1.00. This study revealed the existence of variability among accesses of genipap and showed that the ISSR molecular markers are efficient tools on the detection of variation into the genome of the species, important for its conservation and management.

Keywords: genomic DNA, leaf tissue, CTAB.

INTRODUÇÃO

O jenipapeiro é uma planta bastante conhecida pelas comunidades rurais da Bahia, principalmente pelas do Recôncavo. Porém, as relações existentes entre o homem do campo com esta espécie sempre foi, e ainda é, exploração extrativista principalmente dos frutos (SOUZA et al., 2007). A prática corrente é a preservação das árvores que produzam bons frutos e as que não servem para essa finalidade são transformadas em madeira para diversos fins, inclusive para atender ao mercado madeireiro clandestino. Esta prática tem reduzido o número de indivíduos e, conseqüentemente, a variabilidade genética dessa espécie, colocando-a em risco.

Considerando a importância socioeconômica da espécie, o seu potencial para atender ao mercado de frutas e madeira da região e a carência de informações sobre a variabilidade genética da espécie, urge a necessidade de trabalhos científicos que gerem conhecimentos que viabilizem programas de conservação, de manejo e de melhoramento genético.

Para o desenvolvimento dessas atividades, o conhecimento da variabilidade genética é muito importante para o direcionamento dos programas. Neste sentido, os marcadores moleculares têm-se mostrado como ferramenta útil e rápida para acessar a variabilidade em nível de DNA isenta da interferência do ambiente, gerando informações que poderão ser de grande valor para a conservação e manejo dos recursos genéticos vegetais (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; RUANE, 1999; CAIXETA et al., 2009).

Os marcadores moleculares permitem análise das variações genômicas das espécies vegetais e manutenção da variabilidade genética entre e dentro de populações naturais (BORNET e BRANCHARD, 2001; GUO et al., 2009; REDDY et al., 2002; PADMESH et al., 2006; SOUZA et al., 2008; CAIXETA et al., 2009; PEREIRA et al., 2009). Dentro da classe de marcadores moleculares baseados na técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), o ISSR (Inter simple sequence repeat) tem sido usado nas análises de divergência genética por apresentar custos baixos, rapidez de acesso a variabilidade ao nível do DNA e potencial de repetibilidade nas análises intraespecíficas (WILLIAMS et al., 1990; BORNET e BRANCHARD, 2001; REDDY et al., 2002; PADMESH et al., 2006; CAIXETA et al., 2009). O marcador ISSR permite amplificação de regiões do

genoma que podem ser transcritas, bem como regiões não codificadas (ZIETKIEWICZ et al., 1994; REDDY et al., 2002; LIU et al., 2012).

O marcador ISSR é baseado em motivos microsatélites que não necessitam de informações prévias da sequência do genoma da espécie (ZIETKIEWICZ et al., 1994; REDDY et al., 2002; SOUZA et al., 2008). Segundo Liu et al., (2012), os marcadores ISSR são eficazes na avaliação do nível de polimorfismo e divergência genética, bem como, identificação da variabilidade genética em populações naturais. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a diversidade genética entre 35 acessos de jenipapeiro por meio de marcadores moleculares do tipo ISSR.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizados 35 acessos de jenipapeiros de um experimento de manejo silvicultural instalado em junho de 2009 no Campus Experimental da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas, Bahia (39°06'23" Sul e 12°40'39" Oeste, com altitude de 226 metros). Segundo classificação de Köppen, o clima é do tipo tropical quente e úmido. A precipitação média é de 1.224 mm/ano, a temperatura média anual de 24,5°C e a umidade relativa do ar de aproximadamente 82%. O solo é do tipo latossolo amarelo distrófico com baixos pH e CTC (SOARES FILHO et al., 2008).

O experimento é constituído por 500 plantas oriundas de mudas obtidas de sementes coletadas de jenipapeiros distribuídos no município de Cruz das Almas. As mudas foram produzidas pelo método de semeadura direta em sacos plásticos com dimensões de 15 x 28 cm no viveiro do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB) da UFRB.

Seleção e coleta de material vegetal

Dessa população, foram selecionados aleatoriamente 35 acessos para caracterização molecular. Folhas jovens e sadias foram colhidas, de cada planta, para extração do DNA genômico no Laboratório do Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia (NBIO).

Extração do DNA genômico

O DNA total foi extraído de acordo com o protocolo CTAB (brometo de cetiltrimetilamonio) descrito por Doyle e Doyle (1990) modificado. Para cada acesso, macerou-se aproximadamente 300 mg de tecido vegetal em almofariz na presença de nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para microtubos de 2 mL, ao qual foi adicionado 800 µL do tampão de extração pré-aquecido a 65 °C (CTAB 2,0%, NaCl 1,4 M, Tris HCl 0,1 M pH 8,0, EDTA 20 mM, 2-mercaptoetanol 0,8%, PVP (Polivinilpirrolidona) 2,0% e água ultra-pura q.s.p).

As misturas foram homogeneizadas mecanicamente por 30 segundos e incubadas em banho-maria a 65°C por 45 minutos com homogeneização a cada 15 minutos. Após a retirada do banho-maria, adicionou-se 700 µL da mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) que foi suavemente homogeneizada e centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos. Estas duas últimas etapas foram repetidas mais uma vez com a finalidade de melhorar a qualidade do material isolado.

O sobrenadante de cada amostra foi transferido para microtubos de 1,5 mL aos quais se adicionou 450 µL de álcool Isopropílico gelado e, após homogeneizar suavemente, incubou-se a -20 °C por três minutos.

Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 600 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 + EDTA 1 mM), deixando repousar por 1:30 horas na geladeira para o DNA ressuspender e, em seguida, adicionou-se 200 µL de acetato de amônio a 7,5 M. As amostras foram misturadas suavemente por inversão para homogeneizar a solução, sendo posteriormente incubada no gelo por 15 minutos. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 8000 rpm.

Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL e a este se adicionou 800 µL de etanol absoluto para, em seguida, incubá-lo por uma hora a -20°C. Decorrido esse tempo, o material foi centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm.

Posteriormente, o precipitado foi lavado duas vezes seguidas com 500 µL de etanol 70% (v/v), seguidas de centrifugação por cinco minutos a 12000 rpm. Após

a centrifugação, o álcool foi descartado e o precipitado (pelet) colocado para secar.

Após seco, o precipitado foi ressuspenso em 100 μ L de TE com 2 μ L de RNase (10 mg/ml) e incubado em banho-maria a 37°C por uma hora. Findo esse tempo, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

Vale ressaltar que o DNA extraído de jenipapeiro, quando armazenado por longo tempo em freezer -20°C, pode degradar ou ocorrer a aglutinação dos fragmentos, inviabilizando a PCR.

Quantificação do DNA e preparação das amostras

Foram feitas avaliações da qualidade e quantidade do DNA extraído, utilizando-se 5 μ L do DNA diluído em 5 μ L de solução corante de azul de bromofenol e glicerol (25% e 30%, respectivamente). Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídeo, em tensão constante de 80 V por uma hora. A quantidade de DNA foi avaliada por análise comparativa entre o DNA extraído de cada amostra e um DNA de concentração conhecida (DNA lambda-Invitrogen) em transluminador de UV e fotodocumentados por sistema digital Vilber Lourmat.

Após quantificação, as amostras foram diluídas em tampão TE para ajustar as suas concentrações para condição de trabalho (5ng/ μ L).

Seleção dos iniciadores ISSR

Foram testados 103 iniciadores ISSR em DNA genômico de três acessos de *G. americana*. O critério de seleção foi a avaliação da nitidez dos fragmentos amplificados. Apenas os oligonucleotídeos que exibiram boa resolução foram selecionados para a etapa de amplificação.

Amplificação do DNA

As reações de amplificação foram preparadas em um volume final de 15 μ L, contendo cada uma: 1,5 μ L de tampão 10 X (50 mM Tris-HCl, 20 mM KCl), 0,6 μ L de dNTPs mix (2,5 mM de cada), 1,5 μ L de MgCl₂ (50 mM), 1,8 μ L de iniciador

ISSR (2,5 mM), 0,2 μ L de Taq DNA polimerase (5U/ μ L-Invitrogen), 2,0 μ L de DNA genômico (5 ng/ μ L) e água ultra pura q.s.p.

As amplificações foram realizadas em um termociclador Biocycler MJ96+/MJ96G (Biosystems), conforme protocolo estabelecido por Zietkiewicz et al. (1994). O programa de amplificação constou de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, anelamento a 48°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de extensão final a 72°C por 7 minutos.

Eletroforese

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese horizontal, em gel de agarose 1,5% (p/v) corado com brometo de etídeo (0,5 μ L/mL) em tampão TBE 1 X (89 mM Tris-Borato, 2 mM EDTA) em tensão constante de 120 V por 2 horas. Para a corrida eletroforética, adicionou-se 5 μ L de solução corante de azul de bromofenol a 25% e glicerol a 30%. Como padrão de peso molecular, utilizou-se o ladder de 100 pb (invitrogen).

Após eletroforese, o gel foi exposto à luz Ultravioleta para visualização dos fragmentos, sendo fotografado em equipamento de fotodocumentação transluminador Vilber Lourmat.

Análise estatística

Os dados multivariados obtidos foram apresentados numa matriz binária de presença (1) e ausência (0) de bandas polimórficas. A dissimilaridade genética entre as plantas foi estimada com base no complemento do coeficiente de similaridade Jaccard (1908), gerando uma matriz de dissimilaridade que foi utilizada para a análise de agrupamento dos acessos.

O dendrograma foi obtido pelo método de agrupamento baseado na média aritmética não ponderada entre grupos (UPGMA) e construído a partir da matriz de dissimilaridade de Jaccard (Figura 2).

A matriz de dissimilaridade e a análise de agrupamento foram validadas pelo coeficiente de correlação cofenética (r).

Para a definição de grupos, traçou-se uma linha de corte paralela ao eixo horizontal do dendrograma obtido da análise de agrupamento. A linha de corte foi obtida pela média das distâncias da matriz de dissimilaridade de Jaccard.

A análise discriminante foi utilizada para verificar a distinção e classificação dos grupos obtidos pela análise de agrupamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 103 iniciadores ISSR testados na reação em cadeia da polimerase (PCR), 22 primers foram considerados bons por produzirem fragmentos com bom padrão de amplificação nas amostras do DNA de jenipapeiro. Por isso, foram utilizados para genotipagem de 35 acessos de jenipapeiros (Tabela 1).

Entre os 22 primers ISSR utilizados para a amplificação do DNA genômico de jenipapeiro, 19 produziram fragmentos polimórficos (Tabela 1). Esses iniciadores permitiram a obtenção de 106 fragmentos amplificados, dos quais 86% foram polimórficos. O número médio de bandas polimórficas por iniciadores (4,8) foi obtido tendo os primers DICA3'T e TriCAC5'CY produzido o maior número de bandas polimórficas (oito), enquanto que o primer TriCAG3'YC amplificou apenas um fragmento polimórfico (Tabela 1).

Os fragmentos amplificados variaram de 260 a 2000 pb, valores que estão nos limites previstos para esse tipo de marcador em espécies eucarióticas (ZIETKIEWICZ et al., 1994). As bandas polimórficas mais nítidas foram utilizadas nesse estudo e as Figura 1 (A e B) ilustram o padrão eletroforético obtido com os iniciadores TriCAC3'YC , TriCAC5'CY e DICA3'C.

Tabela 1. Iniciadores ISSR (*Inter simple sequence repeat*) utilizados na genotipagem dos 35 acessos de *Genipa americana* L.

Nº Primer	Primer	Sequência	NTB	BP	P (%)	AF (pb)
831	DICA3'RG	CACACACACACACACARG	7	6	85,7	500 – 1100
839	DIGA3'C	GAGAGAGAGAGAGAGAC	4	3	75,0	680 – 1000

Continua...

Tabela 1. Continuação.

840	DIGA3'RC	GAGAGAGAGAGAGAGARC	7	7	100,0	500 – 1200
841	DIGA3'T	GAGAGAGAGAGAGAGAT	8	8	100,0	260 – 1150
852	DIGT5'A	AGTGTGTGTGTGTGTGT	7	7	100,0	430 – 1080
857	TriCAC3'RC	CACCACCACCACCACRC	7	6	85,7	490 – 2000
858	TriCAC3'YC	CACCACCACCACCACYC	7	6	85,7	550 – 1140
859	TRICAC5'CR	CRCACCACCACCACCAC	3	2	66,7	560 – 1050
860	TriCAC5'CY	CYCACCACCACCACCAC	9	8	88,9	390 – 1150
863	TriCAG3'YC	CAGCAGCAGCAGCAGYC	3	1	33,3	630 – 1180
864	TriCAG5'CR	CRCAGCAGCAGCAGCAG	4	4	100,0	490 – 900
865	TriCAG5'CY	CYCAGCAGCAGCAGCAG	5	4	80,0	490 – 900
866	TriGTG	GTGGTGGTGGTGGTG	7	7	100,0	360 -1140
867	TriGTG3'RC	GTGGTGGTGGTGGTGRC	6	5	83,3	600 – 1150
868	TriGTG3'YC	GTGGTGGTGGTGGTGYC	4	4	100,0	650 – 1190
887	TriAGA3'RC	AGAAGAAGAAGAAGARC	1	0	0,0	-
890	TriAGG3'RC	AGGAGGAGGAGGAGGRG	1	0	0,0	-
900	TriTCC3'RC	TCCTCCTCCTCCTCCRC	6	6	100,0	500 -1300
907	TriCAC3'RC	CACCACCACCACCACRC	4	3	75,0	440 -1600
912	TriCCT3'RC	CCTCCTCCTCCTCCTRC	2	2	100,0	610 -1500
925	TriGCA3'RC	GCAGCAGCAGCAGCARC	1	0	0,0	-
929	TriGGA3'RC	GGAGGAGGAGGAGGARC	3	2	66,7	560 – 790

NTB: número total de bandas, BP: bandas polimórficas, P(%): porcentagem de bandas polimórficas, AF: amplitude de fragmentos, pb: pares de bases; R = A ou G; Y = T ou C.



Figura1. A - Padrão de amplificação do DNA genômico de 18 acessos de *Genipa americana* L. obtido por meio dos iniciadores ISSR TriCAC3'YC e TriCAC5'CY.

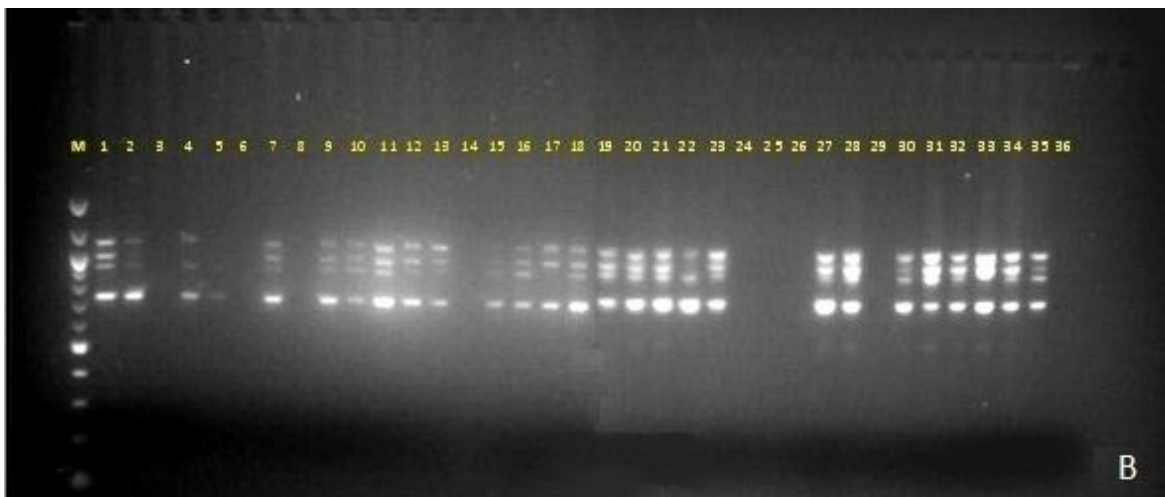


Figura1. B - Padrão de amplificação do DNA genômico de 35 acessos de *Genipa americana* L. pelo iniciador ISSR DIGA3'C. M: padrão de peso molecular 100pb (*Invitrogen*).

A análise de divergência genética gerou uma matriz de dissimilaridade genética (Tabela 2), mostrando as relações entre os 35 acessos de jenipapeiro. Nessa matriz, verificou-se que os coeficientes de dissimilaridades variaram de 0,14 entre os acessos GEN14 e GEN15 até uma distância máxima de 1,00, envolvendo o acesso GEN3 com os acessos GEN20, GEN24, GEN26, GEN28, GEN29, GEN30 e GEN33, bem como o acesso GEN8 com os acessos GEN20, GEN21, GEN22, GEN23, GEN24, GEN25, GEN29, GEN30 e GEN31, evidenciando a existência de variabilidade genética entre as plantas.

Tabela 02 – Matriz de Distância entre pares de acessos de *Genipa americana* L. estimados a partir de 91 locos marcadores ISSR.

ACESSOS	GEN1	GEN2	GEN3	GEN4	GEN5	GEN6	GEN7	GEN8	GEN9	GEN10	GEN11	GEN12	GEN13	GEN14	GEN15	GEN16	GEN17	GEN18	GEN19	GEN20	GEN21	GEN22	GEN23	GEN24	GEN25	GEN26	GEN27	GEN28	GEN29	GEN30	GEN31	GEN32	GEN33	GEN34	GEN35					
GEN1	-																																							
GEN2	0.46	-																																						
GEN3	0.70	0.75	-																																					
GEN4	0.53	0.48	0.69	-																																				
GEN5	0.63	0.39	0.72	0.31	-																																			
GEN6	0.54	0.35	0.69	0.48	0.40	-																																		
GEN7	0.56	0.65	0.69	0.46	0.43	0.52	-																																	
GEN8	0.63	0.57	0.40	0.63	0.62	0.67	0.50	-																																
GEN9	0.55	0.56	0.75	0.42	0.48	0.31	0.25	0.60	-																															
GEN10	0.42	0.63	0.50	0.59	0.56	0.64	0.43	0.46	0.57	-																														
GEN11	0.63	0.57	0.74	0.46	0.47	0.53	0.42	0.58	0.50	0.48	-																													
GEN12	0.66	0.55	0.73	0.59	0.54	0.53	0.45	0.58	0.48	0.54	0.16	-																												
GEN13	0.56	0.46	0.73	0.57	0.56	0.56	0.64	0.67	0.72	0.60	0.34	0.40	-																											
GEN14	0.60	0.60	0.67	0.48	0.35	0.50	0.36	0.85	0.55	0.39	0.41	0.42	0.59	-																										
GEN15	0.65	0.56	0.67	0.46	0.39	0.33	0.41	0.74	0.50	0.53	0.48	0.53	0.58	0.14	-																									
GEN16	0.45	0.43	0.71	0.33	0.36	0.39	0.30	0.67	0.30	0.37	0.29	0.32	0.45	0.24	0.30	-																								
GEN17	0.63	0.53	0.71	0.52	0.43	0.41	0.41	0.59	0.50	0.54	0.37	0.35	0.38	0.32	0.30	0.32	-																							
GEN18	0.46	0.48	0.60	0.51	0.53	0.42	0.42	0.53	0.39	0.41	0.43	0.44	0.50	0.50	0.45	0.26	0.33	-																						
GEN19	0.76	0.71	0.81	0.69	0.71	0.84	0.70	0.92	0.70	0.71	0.61	0.70	0.68	0.63	0.70	0.67	0.64	0.72	-																					
GEN20	0.77	0.69	1.00	0.72	0.76	0.89	0.78	1.00	0.74	0.74	0.70	0.76	0.68	0.77	0.82	0.72	0.76	0.74	0.42	-																				
GEN21	0.78	0.70	0.88	0.76	0.75	0.88	0.76	1.00	0.80	0.70	0.66	0.74	0.67	0.71	0.76	0.73	0.70	0.75	0.19	0.42	-																			
GEN22	0.80	0.71	0.87	0.73	0.76	0.92	0.78	1.00	0.87	0.69	0.65	0.71	0.68	0.66	0.78	0.74	0.72	0.77	0.26	0.45	0.19	-																		
GEN23	0.74	0.73	0.86	0.68	0.74	0.95	0.72	1.00	0.76	0.68	0.64	0.73	0.67	0.65	0.77	0.70	0.69	0.75	0.40	0.43	0.40	0.33	-																	
GEN24	0.82	0.67	1.00	0.77	0.67	0.89	0.75	1.00	0.67	0.80	0.72	0.74	0.71	0.73	0.72	0.70	0.71	0.73	0.50	0.41	0.43	0.50	0.32	-																
GEN25	0.90	0.73	0.93	0.82	0.74	0.92	0.84	1.00	0.87	0.79	0.74	0.77	0.76	0.80	0.81	0.83	0.82	0.88	0.53	0.38	0.38	0.44	0.44	0.48	-															
GEN26	0.85	0.75	1.00	0.81	0.75	0.87	0.77	0.91	0.88	0.77	0.67	0.69	0.71	0.73	0.81	0.77	0.74	0.76	0.34	0.42	0.27	0.19	0.33	0.45	0.36	-														
GEN27	0.80	0.72	0.94	0.73	0.78	0.89	0.76	0.91	0.78	0.75	0.63	0.72	0.66	0.81	0.81	0.75	0.72	0.74	0.21	0.46	0.17	0.23	0.41	0.48	0.43	0.32	-													
GEN28	0.79	0.73	1.00	0.76	0.75	0.84	0.73	0.92	0.77	0.71	0.61	0.67	0.67	0.74	0.80	0.70	0.70	0.68	0.27	0.39	0.18	0.21	0.38	0.51	0.43	0.15	0.21	-												
GEN29	0.78	0.84	1.00	0.84	0.93	0.95	0.77	1.00	0.81	0.79	0.82	0.87	0.77	0.86	0.88	0.80	0.88	0.84	0.56	0.41	0.53	0.59	0.46	0.60	0.41	0.56	0.50	0.56	-											
GEN30	0.77	0.83	1.00	0.82	0.86	0.92	0.82	1.00	0.83	0.74	0.77	0.82	0.75	0.79	0.89	0.78	0.81	0.81	0.47	0.38	0.47	0.47	0.37	0.58	0.55	0.35	0.53	0.39	0.52	-										
GEN31	0.65	0.75	0.91	0.63	0.74	0.92	0.75	1.00	0.78	0.57	0.65	0.79	0.67	0.69	0.79	0.65	0.71	0.74	0.42	0.33	0.40	0.43	0.17	0.45	0.33	0.33	0.44	0.42	0.38	0.21	-									
GEN32	0.78	0.69	0.88	0.77	0.74	0.83	0.76	0.75	0.77	0.63	0.60	0.62	0.62	0.69	0.78	0.71	0.65	0.67	0.48	0.50	0.46	0.49	0.48	0.56	0.55	0.44	0.44	0.35	0.67	0.50	0.46	-								
GEN33	0.78	0.74	1.00	0.74	0.76	0.87	0.73	0.91	0.75	0.67	0.65	0.70	0.70	0.71	0.82	0.67	0.73	0.65	0.56	0.38	0.49	0.52	0.39	0.45	0.47	0.39	0.49	0.36	0.58	0.38	0.25	0.33	-							
GEN34	0.74	0.69	0.85	0.76	0.75	0.83	0.68	0.80	0.72	0.55	0.56	0.61	0.69	0.59	0.77	0.65	0.67	0.64	0.58	0.49	0.52	0.52	0.47	0.55	0.46	0.48	0.51	0.50	0.57	0.54	0.38	0.40	0.32	-						
GEN35	0.85	0.71	0.86	0.74	0.70	0.81	0.76	0.82	0.79	0.68	0.62	0.67	0.74	0.63	0.71	0.69	0.71	0.71	0.47	0.42	0.47	0.48	0.47	0.45	0.43	0.46	0.52	0.48	0.62	0.48	0.39	0.38	0.38	0.28	-					

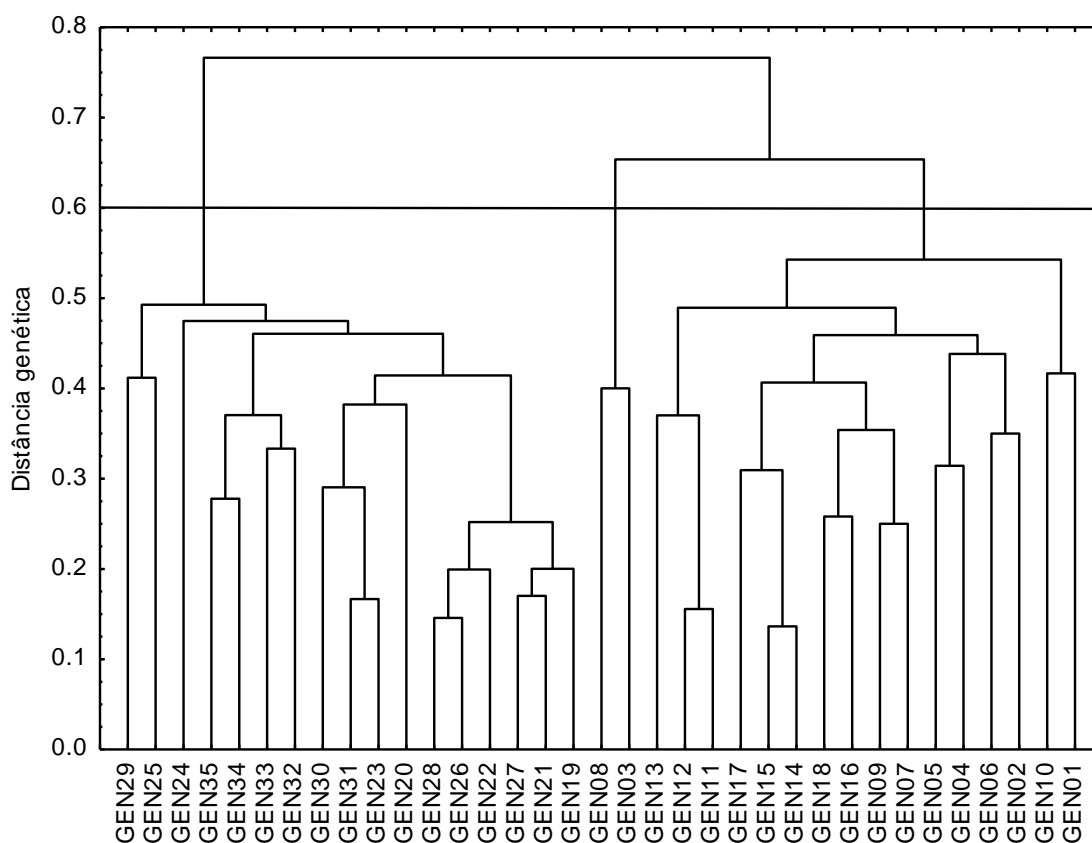


Figura 2 – Dendrograma de agrupamento de 35 acessos de jenipapeiro obtido da análise de agrupamento, utilizando o método da média aritmética ponderada (UPGMA). Cruz das Almas, Bahia, 2012.

A partir da análise do dendrograma de diversidade genética dos acessos de jenipapeiros, com base em 91 fragmentos polimórficos de ISSR, observa-se a formação de três grupos distintos. Tomou-se como referência para fixação da linha de Corte a média das distâncias da matriz de similaridade $\geq 0,60$. A análise do dendrograma mostra que os acessos GEN 03 e o GEN 08 formam um grupo, enquanto que os demais acessos se distribuem em dois grupos, respectivamente, 16 e 17 indivíduos.

O valor obtido na análise de correlação cofenética ($r=0,892$, $p \leq 0,0001$) indica a existência de precisão significativa na correlação entre a matriz de dissimilaridade de Jaccard e a matriz de agrupamento. Esse valor é considerado alto e adequado, visto que, segundo Vaz Patto (2004), valores de $r > 0,56$ são considerados ideais porque refletem um bom ajuste entre as matrizes de dissimilaridade e de agrupamento. Dessa forma, por meio da avaliação visual do

dendrograma e da matriz original, pode-se fazer inferências seguras sobre eficiência da técnica utilizada. Portanto, esses resultados demonstram a eficiência da técnica de marcadores moleculares ISSR para a detecção da divergência genética no jenipapeiro.

A validação da escolha do método para definição do número de grupos pela análise discriminante mostra 100% de classificação (Tabela 3). Esta classificação, baseada na alocação dos acessos em cada um dos três grupos predefinidos, confirmam a análise de agrupamento UPGMA e a dissimilaridade genética encontrada entre os acessos.

Tabela 3 – Número de acessos de jenipapeiro e percentagem de classificação correta obtidas da análise discriminante.

Grupo	Classificação prevista			Total	Classificação (%)
	(III) P=0,45714	(II) P=0,05714	(I) P = 0,48751		
III	16	0	0	16	100
II	0	2	0	2	100
I	0	0	17	17	100
Total	16	2	17	35	100

Os resultados obtidos na matriz de distância (Tabela 2) e dendrograma (Figura 2) evidenciam a existência de variabilidade genética nos acessos de jenipapeiros detectada por marcadores moleculares ISSR. Apesar das pesquisas com marcadores moleculares e bioquímicos na espécie ainda serem raros, os resultados obtidos são compatíveis com os encontrados por Hansen (2006), que utilizando 17 iniciadores RAPD em 25 genótipos de jenipapeiros do Recôncavo Baiano, detectou grande variabilidade genética entre as plantas avaliadas com a formação de oito grupos distintos. Santos (2007), fazendo uso de 12 iniciadores RAPD para avaliar a diversidade genética de 18 genótipos de jenipapeiros da região do Baixo São Francisco Sergipano, obteve a formação de três grupos com ampla variabilidade genética entre as plantas.

Elevados níveis de diversidade genética na espécie também foram detectados por Sebbenn et al. (1998, 2003) em estudos envolvendo eletroforese

de isoenzimas em população natural de jenipapeiros da Estação Ecológica de Moji Guaçu/SP.

Segundo Sebbenn et al. (2003), o estudo da variabilidade genética do jenipapeiro é de grande importância para o estabelecimento de estratégias de conservação do germoplasma, coleta de sementes para suprir programas diversos e manejo da espécie.

A eficácia dos marcadores ISSR em análise de genoma tem sido relatada para estudo da variabilidade genética de espécies de plantas, tais como: café (RUAS et al., 2003), umbu-cajazeira (SANTANA, 2011), maracujá (SANTOS et al., 2011), Chá selvagem da China (LIU et al., 2012). Esses marcadores estão sendo utilizados com sucesso em diversos estudos de caracterização molecular em espécies eucarióticas. Em plantas, têm sido utilizados para fingerprinting de cultivares (RUAS et al., 2003; COSTA et al., 2011; LIU et al., 2012); ALMEIDA et al., 2009); diversidade entre e dentro de populações naturais da mesma espécie (LIU et al., 2012); divergência genética entre acessos de banco de germoplasma (SANTANA et al., 2011; COSTA et al., 2011).

Além destas aplicações, o ISSR também pode ser empregado em estudos relacionados a análises filogenéticas, mapeamento do genoma de espécies vegetais, em seleção assistida, bem como em teste de hipótese de especiação (REDDY et al., 2002).

A versatilidade e repetibilidade do ISSR fez com que alguns pesquisadores desenvolvessem pesquisas comparando sua eficiência com a de outros marcadores, tais como: RAPD (NAGAOKA e OGIHARA, 1997; SALEH, 2011; MORALES et al., 2011); RFLP (NAGAOKA e OGIHARA, 1997) e Microssatélites (NIJRU et al., 2007). Na maioria dos estudos, o ISSR revelou-se como ferramenta adequada e capaz de substituir os outros sem comprometer os resultados com a vantagem de ter menor custo e boa repetibilidade.

No presente trabalho, também foi confirmada a utilidade do ISSR na caracterização de germoplasma de jenipapeiro, onde se utilizou um conjunto de 19 primers que amplificaram 86% de locos polimórficos permitindo, assim, avaliar a diversidade genética dos acessos estudados. Esses resultados mostram que este marcador foi eficiente para o estudo da diversidade genética da espécie, podendo esta informação ser de grande importância para o estabelecimento de estratégia de conservação de germoplasma, coleta de sementes e manejo.

CONCLUSÕES

1. Os marcadores moleculares baseados em ISSR são ferramentas eficazes para avaliar a variabilidade genética da espécie *Genipa americana* L.
2. Os 19 iniciadores ISSR utilizados na genotipagem dos acessos de jenipapeiro, apresentam boa amplificação, repetibilidade e polimorfismo no DNA genômico da espécie;
3. Existe variabilidade genética entre os 35 acessos de jenipapeiros avaliados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, C. M. A.; LIMA, S. E. N.; LIMA, G. S. A.; BRITO, J. Z.; DONARO, V. M. T. S.; SILVA, M. V. Caracterização molecular de cultivares de cana de açúcar. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 33, p. 1771-1776, 2009.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Noncorede inter simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for Genome Fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, Canada, v. 19, n. 3, p. 209-215, 2001.
- CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed) **Marcadores Moleculares**. Viçosa, v. 1, p. 11-94, 2009.
- COSTA, R. C.; PEREIRA, T. N. S.; GABRIEL, A. P. C.; PEREIRA, M. G. ISSR markers for genetic relationship in Caricaceae and sex differentiation in papaya. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, V. 11, n. 4, 2011.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue, **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 3.Ed. . 220p. 1998.

GUO, H. B.; HUANG, K. Y.; ZHOU, T. S.; WU, Q. H.; ZHANG, Y. J.; LIANG, Z. S. DNA isolation, optimization of ISSR-PCR system and primers screening of *Scutellaria baicalensis*. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nairóbi, v. 3, n. 11, p. 898-901, 2009.

HANSEN, D. S. **Avaliação de genótipos de jenipapeiro utilizando marcadores agrônômicos e RAPD**. UFBA. 77 p. Cruz das Almas, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias. Área de concentração Fitotecnia).

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin Society Vaud Science Natural**, v. 44, p. 223-270, 1908.

LIU, B.; SUN, X.; WANG, Y.; LI, Y.; CHENG, H.; XIONG, C.; WANG, P. Genetic diversity and molecular discrimination of wild tea plants from Yunnan Province based on inter-simple sequence repeats (ISSR) markers. **African Journal of Biotechnology**, Nairóbi, v. 11 n. 53, p. 11566-11574, 2012.

MORALES, R. G. F.; RESENDE, J. T. V. ; FARIA, M. V.; Andrade M. C.; RESENDE, L. V.; DELLATORRE, C. A.; SILVA, P. R. Genetic similarity among strawberry cultivars assessed by RAPD and ISSR markers, **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 6, 2011.

NAGAOKA, T.; OGIHARA, Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphism in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers, **Theoretical and Applied Genetics** n. 94, p. 597-602, 1997.

NIJIRU, Z. K.; CONSTANTINE, C. C.; GITONGA, P. K.; TOMPSON, R. C. A.; REID, S. A. Genetic variability of *Trypanosoma evansi* isolates detected by inter-simple sequence repeat anchored-PCR and microsatellite. **Veterinary parasitology**, Murdoch, v. 147, p. 51-61, 2007.

PADMESH, P.; REJI, J. V.; JINISH DHAR, M.; SEENI, S. Estimation of genetic diversity in varieties of *mucuna pruriens* using RAPD. **Biologia Plantarum**, v.50, n. 3, p. 367- 372, 2006.

PEREIRA, M. G.; PEREIRA, T. N. S.; COSTA, F. R. Marcadores Moleculares no Pré-Melhoramento. In: Alúzio Borém; Eveline Teixeira Caixeta. (Org.). **Marcadores Moleculares**. 2 ed. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 2009, v. 1, p. 103-128.

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

RUANE, J. A critical review of the value of genetic distance studies in conservation of animal genetic resources. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, London, v. 116, n. 5, p. 317-323, 1999.

RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; RAMPIM, L.; CARVALHO, V. P.; RUAS, E. A.; SERA, T. Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (Inter-simple sequence repeat) markers. **Genetics and molecular Biology**. São Paulo, v. 26, n. 3, 2003.

SALEH, B. Efficiency of RAPD and ISSR markers in assessing genetic variation in *Arthrocnemum macrostachyum* (Chenopodiaceae), **Brazilian Archives of Biology and Thechology**, Curitiba, v.54, n. 5, 2011.

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**, Jaboticabal, v. 33, n. 3, 2011.

SANTOS, A. R. F. **Variabilidade genética de jenipapo (*Genipa americana* L.) em área de mata ciliar do Baixo São Francisco visando à produção de sementes.** UFS. 30 p. São Cristóvão, 2007. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal)

SANTOS, L. F.; OLIVEIRA, E. J.; SILVA, A. S.; CARVALHO, F. M. ; COSTA, J. L.; PÁDUA, J. G. ISSR Markers as a Tool for the Assessment of Genetic Diversity in *Passiflora*. **Biochem Genet**, v 49, p. 540-554, 2011.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, R. Variabilidade genética, sistema reprodutivo e estrutura genética especial em *Genipa americana* L. através de marcadores isoenzimáticos. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 53, p. 15-30, 1998.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, R. Conservação genética *in situ* e número de matrizes para a coleta de sementes em população de *Genipa americana* L.. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 63, p. 13-22, 2003.

SOARES FILHO, W. S.; LEDO, C. A. S.; PASSOS, O. S.; SOUZA, A. S.; MATTOS, L. A.; QINTELA, M. P. Parentais femininos monoembriônicos na obtenção de porta enxertos híbridos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 215-218, mar. 2008.

SOUZA, C. S; ALVES, S. A; HANSEN, D. S; FONSECA, A. A. O. Correlações entre Caracteres Físicos e Químicos de Jenipapeiros Nativos do Recôncavo Baiano. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 270-272, 2007.

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**, Brasília, v. 43, n. 7, p. 843-849, 2008.

VAZ PATTO, M. C.; SATOVIC, Z.; PEGO, S.; FEVEREIRO, P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germoplasm using microsatellite markers. **Euphitica**, wageningen, v. 137, n.1, p. 63-72, 2004.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; RAFASLKI, J. A; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, 20 p. 176-183,1994.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos dos parâmetros de sobrevivência, altura e diâmetro ao nível do solo revelam a capacidade de adaptação e desenvolvimento do jenipapeiro nas condições edafológicas local.

Por outro lado, os 19 iniciadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) selecionados e utilizados para avaliar a variabilidade genética de 35 acessos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.), instalados em plantio no campus experimental da Universidade Federal do Recôncavo, poderão ser utilizados para genotipar as demais plantas do experimento e quantificar a real variabilidade existente nesta população.

Do mesmo modo, os mesmos iniciadores poderão ser utilizados para selecionar futuras matrizes de jenipapeiros para conservação *in situ* e para coleta de sementes, objetivando programas diversos com a espécie como: conservação *ex situ*, formação de banco clonal, manejo e melhoramento genético.