



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ÉRIKA BEATRIZ DE LIMA CASTRO

**METODOLOGIA NÃO-DESTRUTIVA DE EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DA
SEMENTE DO CAJUEIRO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE
CAJUEIRO DO CERRADO**

FORTALEZA

2023

ÉRIKA BEATRIZ DE LIMA CASTRO

METODOLOGIA NÃO-DESTRUTIVA DE EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DA
SEMENTE DO CAJUEIRO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE CAJUEIRO
DO CERRADO

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Agronomia da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Profa. Dra. Cândida Hermínia
Campos de Magalhães.

Coorientadora: Dra. Patricia do Nascimento
Bordallo.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C353m Castro, Érika Beatriz de Lima.
Metodologia não-destrutiva de extração de DNA a partir da semente do cajueiro e Diversidade genética de acessos de cajueiro do Cerrado / Érika Beatriz de Lima Castro. – 2023.
66 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Agronomia, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Cândida Hermínia Campos de Magalhães.

Coorientação: Profa. Dra. Patricia do Nascimento Bordallo.

1. caju. 2. marcadores moleculares. 3. recursos genéticos. I. Título.

CDD 630

ÉRIKA BEATRIZ DE LIMA CASTRO

METODOLOGIA NÃO-DESTRUTIVA DE EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DA
SEMENTE DO CAJUEIRO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE CAJUEIRO
DO CERRADO

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Agronomia da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Agronomia.

Aprovada em: 28/06/2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cândida Hermínia Campos de Magalhães (Orientadora pedagógica)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Patricia do Nascimento Bordallo (Coorientadora)
Embrapa Agroindústria Tropical

Dra. Ana Cecília Ribeiro de Castro
Embrapa Agroindústria Tropical

Dra. Ingrid Bernardo de Lima Coutinho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

A minha família, por todo o apoio.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Agroindústria Tropical, por ter disponibilizado condições físicas e materiais para a realização de todos os experimentos, pelo apoio financeiro e manutenção da bolsa.

À Dra. Patricia Bordallo, pela orientação técnica e ensinamentos, durante o meu período de estágio e realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Cândida Magalhães por todo o apoio e disponibilidade em ajudar a sanar as dúvidas.

À equipe de funcionários da Embrapa, campo experimental de Pacajus, pelo auxílio nas atividades de campo, preparo dos substratos e sementeio.

Aos pesquisadores da Embrapa, Dra. Ana Cecília Ribeiro de Castro, pela doação das sementes de caju; Dr. Men de Sá Moreira de Souza Filho, pelas sugestões e ajuda na preparação dos materiais selantes; Adriano Lincoln, no preparo dos tubos de aço.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular: Myrella Tabosa, pela ajuda nas análises no laboratório; Regimara Bernardes e Jamille Rabelo, pela ajuda, apoio e ensinamentos.

Aos amigos feitos na graduação, pelo companheirismo e apoio para enfrentar as dificuldades vividas ao longo do curso, o que tornou esses anos mais agradáveis, em especial à Leslyene Freitas, Ítalo Magalhães, Emanuel Magalhães, Renan Gomes, Ivo Rodrigues, Matheus Medeiros, Gabriel Carvalho, Terezinha Byatriz, Jair Roberto, Paulo Marcelo, Ramony Kelly e Lenildo Carlos.

Agradeço a Deus e a minha família, principalmente minha mãe e meu irmão, Maria Elineide e João Erick, por estarem ao meu lado me apoiando e incentivando, são pessoas muito importantes na minha vida.

Aos membros da Banca Examinadora, Dra. Ana Cecília Castro e Dra. Ingrid Bernado, pelo tempo, pelas sugestões e contribuições.

A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho e minha formação.
Obrigada.

“Sempre que começarem a duvidar de si mesmas, sempre que sentirem medo, lembre-se: a coragem é a raiz da mudança, e somos quimicamente programados para mudar.” (*Uma questão de química* - Bonnie Garmus).

RESUMO

A etapa de caracterização de acessos é de fundamental importância tanto na avaliação de uma coleção de germoplasma quanto para um programa de melhoramento genético. Para realização da etapa de caracterização, seja morfológica ou molecular, necessita-se de plantas no campo para observar aspectos da planta em geral ou coletar folhas para extração de DNA, o que demanda maior tempo e custo do processo. Por outro lado, a extração de DNA realizada diretamente na semente permite que o genoma seja acessado sem a necessidade do plantio de todas as sementes, acelerando a escolha de genótipos de interesse e informações sobre a variabilidade genética. Nesse sentido, objetivou-se com esse trabalho desenvolver uma metodologia não-destrutiva de extração de DNA a partir da semente de caju e avaliar a diversidade genética de acessos de cajueiro do Cerrado. Para tanto, o trabalho foi dividido em dois capítulos. No capítulo 1, as sementes foram perfuradas mecanicamente com uma mini retífica, sendo retirada uma amostra do endosperma de cada semente. Para a extração de DNA, foram testados diferentes protocolos e kits comerciais, assim como materiais para selar a abertura feita na semente. Em conclusão, foi possível extrair DNA de cajueiro a partir do endosperma, utilizando, preferencialmente, kits comerciais de extração e cimento cola como material selante para posterior plantio. No capítulo 2, a variabilidade genética de acessos de cajueiro do cerrado foi avaliada de duas maneiras. Uma delas foi por meio da biometria das sementes de sete acessos. Para isso, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo critério de Scott-Knott ($p < 0,05$) e a importância dos caracteres foi feita com base no método de Singh. Utilizando a distância generalizada de Mahalanobis (D^2), foi realizada a análise de agrupamento pelo método UPGMA e o de otimização de Tocher. A outra maneira foi utilizando-se marcadores moleculares RAPD e ISSR para um dos acessos. Para isso, as matrizes de distâncias genéticas foram construídas pelo complemento aritmético do coeficiente de Jaccard, obtidas dos dados binários gerados das bandas dos marcadores moleculares. A partir das matrizes de dissimilaridade foi realizada a análise de agrupamento pelo método UPGMA e o de otimização de Tocher. Os resultados biométricos e moleculares indicam variabilidade genética entre e dentro dos acessos. Os métodos de biometria e de marcadores moleculares baseados em RAPD e ISSR são eficazes em identificar variabilidade entre sementes de cajueiro do Cerrado.

Palavras-chave: caju; marcadores moleculares; recursos genéticos.

ABSTRACT

The accession characterization step is of fundamental importance for both evaluation of a germplasm collection and for genetic breeding program. Actual plants in the field are needed to permit a characterization step, whether morphological or molecular, to observe overall aspects of the plant or to collect leaves for DNA extraction, a process that demands considerable amounts of time and resources. On the other hand, DNA extraction performed directly on the seed allows the genome to be accessed without the need to plant all the seeds, accelerating the choice of genotypes of interest and information on genetic variability. In this sense, the objective of this work was to develop a non-destructive methodology for extracting DNA from cashew seeds and to evaluate the genetic diversity of cashew tree accessions from the Cerrado. The work was divided into two chapters. In chapter 1, the seeds were mechanically perforated with a mini grinder, and a sample of the endosperm of each seed was taken. For DNA extraction, different protocols and commercial kits were tested, as well as materials to seal the opening made in the seed. In conclusion, it is possible to extract cashew tree DNA from the endosperm, preferably using commercial extraction kits and cement as a sealing material for later planting. In chapter 2, the genetic variability of Cerrado cashew tree accessions was assessed in two ways. One was through biometry of seeds of seven accessions. For this, the data were submitted to analysis of variance and the averages compared using the Scott-Knott criterion ($p < 0.05$) and the importance of the characters was made based on Singh's method. Using the generalized Mahalanobis distance (D^2), cluster analysis was performed based on UPGMA and Tocher's optimization method. The other way of assessment was performed using RAPD and ISSR molecular markers for one of the accessions. For this, genetic distance matrices were constructed by arithmetic complement of the Jaccard coefficient, obtained through binary data from molecular marker bands. From the dissimilarity matrices, cluster analysis was performed using UPGMA and Tocher's optimization method. Biometric and molecular results indicate there is genetic variability between and within accessions. The methods of biometrics and molecular markers based on RAPD and ISSR are effective in identifying variability among Cerrado cashew tree seeds.

Keywords: cashew; molecular markers; genetic resources.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1 – Equipamentos utilizados para perfuração das sementes..... 29
- Figura 2 – Sementes do clone CCP 06 perfuradas..... 30
- Figura 3 – Sementes perfuradas do clone CCP 06, inviáveis por excesso de água..... 33
- Figura 4 – Material sendo macerado com auxílio do pistilo..... 34
- Figura 5 – Gel de agarose mostrando o DNA bruto resultados dos protocolos e kits testados do clone CCP 06..... 35
- Figura 6 – Resultado da amplificação dos DNAs do clone CCP 06 com primers ISSR nos diferentes protocolos de extração testados..... 37
- Figura 7 – Resultado da extração de DNA do acesso BGC 676 através do *Wizard Genomic DNA Purification* kit (Promega)..... 38
- Figura 8 – Resultado da amplificação dos DNAs do acesso BGC 676, com primer ISSR 848, para validação da metodologia de extração..... 39

Capítulo 2

- Figura 1 – Locais de coleta dos acessos de cajueiro em Goiás..... 46
- Figura 2 – Dimensões da castanha quanto a medidas de comprimento (l), largura (w) e espessura (t)..... 47
- Figura 3 – Sementes de cada árvore de cada acesso de cajueiro do Cerrado..... 48
- Figura 4 – Sementes de cada árvore dos acessos de cajueiro do Cerrado apresentando diferenças biométricas..... 53
- Figura 5 – Dendrograma de dissimilaridade genética (UPGMA) com os 27 indivíduos/árvores de cajueiro do Cerrado, obtido por meio da distância generalizada de Mahalanobis (D^2), estimado com base nos caracteres biométricos das sementes..... 54
- Figura 6 – Dendrograma de dissimilaridade genética (UPGMA) em 20 indivíduos do acesso BGC 676, obtido por meio do complemento aritmético do 58

coeficiente de Jaccard, estimado com base em 10 marcadores
RAPD.....

Figura 7 – Dendrograma de dissimilaridade genética (UPGMA) em 20 indivíduos do
acesso BGC 676, obtido por meio do complemento aritmético do coeficiente
de Jaccard, estimado com base em 10 marcadores
ISSR..... 59

Figura 8 – Dendrograma de dissimilaridade genética (UPGMA) em 20 indivíduos do
acesso BGC 676, obtido por meio do complemento aritmético do coeficiente
de Jaccard, estimado com base em 10 marcadores RAPD e 10 marcadores
ISSR..... 60

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1	– Primers ISSR utilizados em ampliações de DNA do clone CCP 06.....	32
Tabela 2	– Resumo da Análise de Variância: Quadrados médios (QM) e Coeficiente de variação (CV) para o teste de germinação.....	34
Tabela 3	– Quantificação e avaliação da qualidade do DNA do clone CCP 06 através do NanoDrop 2000 (<i>Thermo Scientific</i>).....	36
Tabela 4	– Quantificação de DNA do acesso BGC 676 através do NanoDrop 2000 (<i>Thermo Scientific</i>).....	39

Capítulo 2

Tabela 1	– Acessos de cajueiro do Cerrado (Estado de Goiás).	45
Tabela 2	– Médias do comprimento (COMP), largura (LARG) e espessura (ESP) da semente, de 27 indivíduos/árvores de cajueiro.....	52
Tabela 3	– Contribuição relativa para divergência das variáveis avaliadas em 27 indivíduos/árvores de cajueiro do Cerrado, por meio da metodologia de Singh (1981)	53
Tabela 4	– Formação de grupos de indivíduos/árvores estabelecidos pelo método de Tocher, com base na distância generalizada de Mahalanobis (D^2)	55
Tabela 5	– Lista de primers polimórficos RAPD e ISSR selecionados em ampliações de DNA do acesso BGC 676.....	57
Tabela 6	– Formação de grupos de indivíduos estabelecidos pelo método de Tocher de acordo com o marcador molecular do acesso BGC 676.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
BAG	Banco Ativo de Germoplasma
CCC	Coefficiente de Correlação Cofenética
CV	Coefficiente de variação
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISSR	<i>Inter-Simple Sequence Repeats</i>
LCC	Líquido da Castanha do Caju
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
QM	Quadrados médios
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphism DNA</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
UPGMA	<i>Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Microlitro
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	Características gerais do cajueiro.....	18
2.2	Recursos genéticos e Banco Ativo de germoplasma (BAG)	19
2.2.1	<i>Banco de Germoplasma de cajueiro.....</i>	20
2.3	Diversidade genética.....	20
	REFERÊNCIAS.....	23
	Capítulo 1: Metodologia não-destrutiva de extração de DNA a partir de semente de cajueiro.....	27
1	INTRODUÇÃO.....	27
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1	Coleta do material.....	28
2.2	Determinação de material selante e teste de germinação preliminar.....	30
2.3	Teste de germinação definitivo.....	31
2.4	Extração de DNA da semente do clone CCP 06.....	31
2.5	PCR para verificar a viabilidade dos DNAs extraídos.....	31
2.6	Validação do protocolo em sementes de cajueiro do Cerrado.....	32
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
3.1	Comparação de selantes e teste preliminar de germinação.....	33
3.2	Teste de germinação definitivo.....	33
3.3	Preparação das amostras para extração de DNA.....	34
3.4	Extração de DNA do clone CCP06.....	34
3.5	PCR para verificar a viabilidade dos DNAs extraídos.....	37
3.6	Validação do protocolo de extração de DNA em sementes de cajueiro do Cerrado.....	38
4	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS	41
	Capítulo 2: Diversidade genética em acessos de cajueiro do cerrado.....	43
1	INTRODUÇÃO.....	43
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1	Diversidade genética por meio da biometria das sementes.....	45

2.2	Diversidade genética baseada em marcadores moleculares.....	48
2.2.1	<i>Condições da PCR</i>	49
2.2.2	<i>Análises estatísticas</i>	49
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
3.1	Diversidade genética das sementes por dados biométricos de sementes.....	51
3.2	Diversidade genética baseada em marcadores moleculares.....	56
4	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

A agricultura é uma atividade que está em constante mudança, sujeita as mudanças climáticas e a outros fatores naturais ou de interferência antrópica (BURLE, 2019). Diante disso, torna-se essencial que os recursos genéticos sejam conservados, pois eles podem deter variabilidade genética necessária para evitar perdas, devido, principalmente, a pragas ou doenças (SALOMÃO et al., 2019). Permite-se que se tenha material genético com alelos interessantes disponíveis, caso seja necessário utilizar em situações futuras (BURLE, 2019).

Os programas de melhoramento devem ter acesso a uma coleção de germoplasma para que se tenha um repositório de genes (SOUZA et al., 2019). Essas coleções podem ser mantidas em Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs), em que é feita a caracterização e avaliação dos materiais genéticos para obter informações sobre a variabilidade (OLIVEIRA et al., 2020), e para a seleção de genótipos que serão estudados em programas de melhoramento vegetal, dentre outros. Essas informações, também são úteis para conhecer a diversidade conservada, elaboração de estratégias de conservação e facilitar o uso dos recursos genéticos (WADE et al., 2020).

A caracterização dos recursos genéticos é feita baseada em descritores que levam em consideração diversos aspectos da planta (FALEIRO et al., 2020). Dentre os descritores disponíveis, os morfológicos são muito utilizados para caracterização nos BAGs, pois são considerados econômicos, principalmente, se for realizada em um grupo maior de indivíduos (PAIVA et al., 2019). Outro descritor utilizado é o molecular, que também se destaca como uma forma de avaliação da diversidade genética (WADE et al., 2020), sendo feita por meio do uso de marcadores moleculares, que também é utilizada na caracterização de coleções de germoplasma (SOUZA et al., 2019). Para o cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), há poucas informações disponíveis de estudos moleculares, sendo utilizado marcadores aleatórios, como RAPD e ISSR, para avaliar o genoma, pois eles aumentam as possibilidades de identificação de polimorfismo (HAWERROTH et al., 2019). Além disso, esses marcadores moleculares, são eficientes no tempo e custo, quando comparados com outros tipos de marcadores (GIACHINO, 2020).

No cajueiro, a conservação é feita, principalmente, por meio de plantas a campo e sementes armazenadas em câmara fria (CASTRO, 2020). Entretanto, quando a coleta do material é feita em locais muito distantes, a conservação acaba sendo realizada apenas via semente, pois não é possível conservar todos os materiais em campo, aguardar seu crescimento vegetativo e reprodutivo, para então caracterizar o material com base nos

descritores morfológicos. Mesmo fazendo uso de descritores moleculares, normalmente isso é feito a partir do DNA extraído de folhas, obrigatoriamente necessitando do plantio das sementes.

Diante dessa problemática, objetivou-se com esse trabalho desenvolver uma metodologia não-destrutiva de extração de DNA a partir da semente de caju e avaliar a diversidade genética de acessos de cajueiro do Cerrado coletado de populações naturais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características gerais do cajueiro

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), é uma árvore originária do Brasil, que pode ocorrer em áreas tropicais como na América (LAYEK et al., 2021) e em outros lugares de clima semelhante, como Índia e África Oriental (JEYAVISH NU et al., 2021). Isso se deve a características que permitem sua boa adaptação nessas regiões, como resistência ao estresse hídrico, a altas temperaturas e a solos com baixa fertilidade (SERRANO; PESSOA, 2016).

O cajueiro pertence à ordem Sapindales (ADEIGBE et al., 2015); Família Anacardiaceae, que é composta por cerca de 70 gêneros e 700 espécies; O gênero *Anacardium* é constituído por cerca de 22 espécies, sendo 21 originárias das Américas do Sul e Central e uma da Malásia. Dentre as 22 espécies citadas apenas a espécie *A. occidentale*, é explorada comercialmente (SERRANO; PESSOA, 2016). Essa espécie foi introduzida em outros países, como África e Ásia, por volta do século XVI pelos portugueses espalhando-se por esses continentes através de dispersores como aves, ratos e humanos (SALAM; PETER, 2010). Posteriormente, espalhou-se para outros locais como Austrália e algumas partes do continente norte-americano (SALAM; PETER, 2010).

De acordo com o IBGE (2021), atualmente o Brasil possui cerca de 427,1 mil hectares plantados com cajueiro, localizados, principalmente, na Região Nordeste, com produção de 111,103 toneladas de castanha. Segundo a mesma fonte, os principais produtores estão na região nordeste, sendo destaque o estado do Ceará (~62%), onde se encontra mais da metade da área colhida, Piauí (~15%) e Rio Grande do Norte (~12%) e os estados da Bahia, Pernambuco e Maranhão complementam quase a totalidade do restante. Isso é resultado de uma boa adaptação da cultura e bom aproveitamento dos seus produtos, pois comercializam-se diferentes partes da planta, como a madeira (oriunda de poda), o pedúnculo (usado na produção de sucos, cajuína, ração animal entre outros produtos), líquido da castanha do caju (LCC - aproveitado na indústria química) e a castanha ou amêndoa, considerada o principal produto para comercialização (BRAINER; VIDAL, 2021). Além disso, essa espécie possui propriedades biológicas (ação antimicrobiana, antioxidantes, efeitos antiulcerogênicos e anti-inflamatórios); o fruto e o pseudofruto são saborosos e ricos em minerais, vitaminas e alguns nutrientes essenciais (SALEHI et al., 2020), contribuindo para sua boa aceitação no mercado e ajuda na renda das famílias produtoras.

Em relação a aspectos morfológicos, o cajueiro é uma planta perene, com

ramificação baixa e porte variado, distinguindo-se em anão-precoce (porte baixo) e comum (porte alto); sistema radicular do tipo pivotante bem desenvolvido e normalmente bifurcada, com raízes laterais que atingem até duas vezes a projeção da copa; folhas simples, inteiras, alternas, glabras, de aspecto subcoriáceo e com pecíolo curto; ramificações intensivas, das quais se originam as panículas, e extensivas, que não resultam em panículas; essas panículas contêm flores masculinas e hermafroditas em proporções variadas e são produzidas na periferia da copa (ARAÚJO et al., 2015). É mais comum a ocorrência de polinização cruzada (entre flores diferentes) no cajueiro, conferindo comportamento de alogamia, pois a estrutura da flor favorece a esse tipo de fecundação (MELO et al., 2013).

O caju é o conjunto formado pela castanha (fruto verdadeiro) e pedúnculo (pedicelo da flor que se desenvolveu ou pseudofruto) (SERRANO; PESSOA, 2016). Esses autores também descrevem a castanha (o fruto verdadeiro) como o conjunto constituído pelo pericarpo (casca) e pela amêndoa (semente), sendo o pericarpo constituído por três camadas: epicarpo (camada mais externa), mesocarpo (camada intermediária da casca) e endocarpo (camada mais interna) (SERRANO; PESSOA, 2016).

Serrano e Pessoa (2016), descreveram a semente do cajueiro como o óvulo da flor desenvolvido após a fecundação, localizando-se na parte interna da castanha. Segundo os mesmos autores, a semente possui três partes:

- Tegumento (película): envoltório pouco rígido, com função de proteger a amêndoa;
- Embrião: formado por duas partes, a radícula (originará o sistema radicular da nova planta) e o caulículo (responsável por formar as primeiras folhas embrionárias e amêndoa);
- Amêndoa: composta por dois cotilédones de coloração branco-amarelada, carnosos e ricos em óleo (ácidos graxos insaturados). É um tecido de reserva com função de armazenar nutrientes que serão utilizados no crescimento inicial.

2.2 Recursos genéticos e Banco Ativo de Germoplasma (BAG)

A conservação dos recursos genéticos é uma atividade indispensável, pois permite que a caracterização e disponibilização da variabilidade genética presente possa oferecer genes que poderão ser utilizados pelos programas de melhoramento a fim de evitar perdas futuras, devido a pragas, doenças ou mudanças climáticas (SALOMÃO et al., 2019). Para isso, a conservação dos recursos genéticos deve ser fundamentada na introdução, coleta, caracterização, avaliação, intercâmbio dos recursos genéticos disponíveis, a fim de conhecer

e, conseqüentemente, armazenar os materiais genéticos (OLIVEIRA et al., 2020; FALEIRO et al., 2020).

Essa conservação pode ser feita fora do seu habitat natural (*ex situ*), sendo manejada em locais de condições artificiais, como nos Bancos Ativos Germoplasma (BAG) (JOSÉ et al., 2019), ou no próprio local de ocorrência (*in situ*), seja de forma espontânea na natureza (nativos) ou nos locais de adaptação (espécies domesticadas ou cultivadas) (SEVILHA et al., 2019). Nesses locais, deve ser feita a caracterização desses indivíduos, baseados em descritores que levam em consideração características morfológicas, agrônômicas, citológicas, bioquímicas, fisiológicas e moleculares (FALEIRO, et al., 2020).

Dentre as caracterizações, a morfológica possui o melhor custo/benefício para ser realizada em um grupo maior e é a prioritária realizadas nos BAGs e núcleos de conservação. Contudo, nos casos de coleções muito grandes e com disponibilidade de recursos financeiros, a caracterização a partir do DNA dos indivíduos (genotipagem) pode ser tornar mais viável, pois seria possível identificar os acessos mais diversos e, a partir disso, fazer uma amostragem para posteriormente ser feita a caracterização morfológica (PAIVA et al., 2019).

2.2.1 Banco Ativo de Germoplasma do cajueiro

O Banco Ativo de Germoplasma do Cajueiro da Embrapa (BAG-Caju), encontra-se no Campo Experimental de Pacajus sendo a maior parte de indivíduos da espécie *A. occidentale* (CASTRO, 2020) e conserva 784 acessos (ALELO, 2023). A coleta de novos materiais é feita anualmente, sendo priorizado a coleta em novas áreas, incluindo populações do Cerrado (CASTRO, 2020). Essa coleta é feita por meio da obtenção de novas sementes, sendo necessário muitos indivíduos para ser representativo, pois o cajueiro possui alto grau de heterozigose (CASTRO et al. 2013).

A caracterização vem sendo realizada por meio de descritores morfológicos da planta, do pedúnculo e do fruto, características químicas, físicas e físico-químicas do pedúnculo e fruto, além da ocorrência da intensidade de doenças (CASTRO, 2020). Além disso, o cajueiro, como espécie predominantemente alógama, com alto grau de heterozigose, necessita de um grande número de amostras afim de representar a variabilidade contida nas populações naturais, o que torna essa atividade onerosa (PAIVA; CRISÓSTOMO; BARROS, 2003).

2.3 Diversidade genética

A caracterização dos recursos genéticos é importante para que se tenha informações sobre a diversidade genética e seja possível desenvolver estratégias de uso e conservação (WADE et al., 2020). Isso é possível por meio da utilização de descritores morfológicos (CARNEIRO et al., 2019) e marcadores moleculares, pois são ferramentas básicas nos estudos em genética da conservação (RAMALHO et al., 2016).

A caracterização morfológica está ligada a características fenotípicas da planta, que podem ser avaliados de forma quantitativa e qualitativa, dependendo dos descritores da espécie, sendo alguns deles: arquitetura da planta, formato da folha, cor da flor, tamanho de sementes e frutos, dentre outros (PAIVA et al., 2019). A partir desses dados é possível obter informações sobre a variabilidade genética da espécie (DANTAS et al., 2019). Dentre os tipos de avaliação morfológica, tem-se a biometria, que é bastante realizada em frutos e sementes, cujos dados podem fornecer informações sobre a variabilidade dentro de populações de uma mesma espécie (GUSMÃO; VIEIRA; JUNIOR, 2006).

Para utilização de marcadores moleculares pressupõe-se que existem diferenças genéticas no DNA (JESUS et al., 2018) e a partir disso, é feita a caracterização molecular do indivíduo, sendo possível evitar a influência do ambiente e a expressão do fenótipo (PAIVA et al., 2019). O uso de marcadores apresenta várias vantagens, dentre elas a obtenção de um número quase que ilimitado de polimorfismos genéticos, a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente, a possibilidade de detecção em qualquer estágio do desenvolvimento da planta, dentre outros (JESUS et al., 2018). Entretanto, ainda é uma técnica de custo elevado, sendo necessário equipamentos específicos e técnicos para realização desses estudos (PAIVA et al., 2019).

Existem vários tipos de marcadores que podem ser utilizados de forma eficiente na caracterização molecular. Os marcadores de DNA são divididos em três categorias principais: os baseados em hibridização, os baseados em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase – *Polymerase Chain Reaction*) e marcadores baseados em sequenciamento (TURCHETTO et al., 2017). Para a estimativa de variabilidade e diversidade genética podem ser utilizados os marcadores baseados em PCR, como RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (PAIVA et al., 2019), dentre outros.

Dentre esses, o RAPD foi o primeiro e o mais simples de todos os marcadores desenvolvidos para avaliar a diversidade genética entre espécies de plantas (DAR; MAHAJAN; SHARMA, 2019). É uma técnica baseada no uso de um único iniciador de 10

bases de sequência arbitrária com 60% ou mais de bases GC, em que os polimorfismos desse marcador resultam da variação de sequência em locais de iniciação ou variação de comprimento na sequência alvo situada entre os locais de ligação do iniciador (GROVER; SHARMA, 2016). Esse marcador permite que se tenha uma análise rápida e simples, além de utilizar quantidades pequenas de DNA e não necessitar de dados preliminares de sequenciamento (YOUNIS et al., 2020).

O ISSR é um marcador comum, também usado para detectar a variação e divergência genética (CHEN et al., 2021). Esse método envolve a amplificação do segmento de DNA, sendo realizada com um único primer consistindo em várias repetições e ancorado geralmente com 2 a 4 nucleotídeos arbitrários (TURCHETTO et al., 2017). Além disso, esses marcadores podem ser utilizados para diversas espécies vegetais sem a necessidade de sequenciamento genético e podem ser indicados para estudos de diversidade e mapeamento genético de populações (FELIX et al., 2020).

Portanto, os marcadores ISSR e RAPD facilmente detectam polimorfismo e tem potencial para determinar níveis de variação intraespecíficos e interespecíficos, além de cobrirem grande parte do genoma (GIACHINO, 2020). Esses marcadores são confiáveis, fáceis de aplicar e versáteis (CUI et al., 2017) e, em comparação com outros marcadores, mostram-se eficientes no tempo e custo, não sendo necessário informações de sequenciamento ou uso de substância radioativa (GIACHINO, 2020).

REFERÊNCIAS

- ADEIGBE, O. O. et al. A review on cashew research and production in Nigeria in the last four decades. **Scientific Research and Essays**, v. 10, n. 5, p. 196-209, 2015.
- ALELO RECURSOS GENÉTICOS. Banco Ativo de Germoplasma de Caju (BAG Caju). Disponível em: <<https://av.cenargen.embrapa.br/avconsulta/Passaporte/detalhesBanco.do?idb=85>>. Acesso em: 04 de julho de 2023.
- ARAÚJO, J. P. P. et al. **Caju: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa, 2015. 250 p.
- BRAINER, M. S. C. P.; VIDAL, M. F. **Cajucultura Nordestina em recuperação**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, ano 3, n. 54, nov. 2021.
- BURLE, M. L. **Conservação de recursos genéticos vegetais na Embrapa—histórico e perspectivas futuras**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019. 14 p.
- CARNEIRO, L.A et al. Morphological characterization and genetic divergence of a cashew population in Floriano, Piauí, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 18, n. 3, p. 1-8, 2019.
- CASTRO, A. C. R., et al. Introdução, coleta e conservação de recursos genéticos do cajueiro. ARAÚJO, J. P. P. (Org.). In: **Agronegócio caju: práticas e inovações**. 1ed. Brasília: Embrapa, 2013, v. 1, p. 467-480.
- CASTRO, A. C. R. Banco Ativo de Germoplasma de Cajueiro: Embrapa Agroindústria Tropical. In: **Bancos e coleções de germoplasma da Embrapa: conservação e uso**. PÁDUA, J. G.; ALBUQUERQUE, M. S.M.; MELO, S. C. M. (Eds.). Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2020. 167 p.
- CHEN, Y. et al. Genetic diversity and variation of Chinese fir from Fujian province and Taiwan, China, based on ISSR markers. **Plos One**, v. 12, p. 1-14, 2017.
- CUI, C.; et al. Determination of genetic diversity among Saccharina germplasm using ISSR and RAPD markers. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, n. 2, p. 76–86, 2017.
- DAR, A. A.; MAHAJAN, R.; SHARMA, S. Molecular markers for characterization and conservation of plant genetic resources. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 89, n. 11, p. 1755-1763, 2019.
- DANTAS, A. C. A. et al. Caracterização morfológica de cajuí (*Anacardium* sp.) do Cerrado Sul Maranhense. **Acta Tecnológica**, v. 14, n. 1, p. 79-91, 2019.
- DYER, G. A. A Primer on Seed and Nut Biology, Improvement, and Use. In: **Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention**. PREEDY, V. R.; WATSON, R. R.; PATEL, V. B. (Ed.). Academic press, 2011.

FALEIRO, F. G. et al. O Gênero Passiflora: diversidade, conservação e uso. In: **Banco de germoplasma de Passiflora L. 'Flor da Paixão': caracterização fenotípica, diversidade genética, fotodocumentação e herborização**. FALEIRO, F. G. et al. (Eds.). Brasília, DF: Pro Impress, 2020. 140 p.

FELIX, F. C. et al. Applications of ISSR markers in studies of genetic diversity of *Pityrocarpa moniliformis*. **Revista Caatinga**, v. 33, p. 1017-1024, 2020.

GIACHINO, R. R. A. Investigation of the genetic variation of anise (*Pimpinella anisum* L.) using RAPD and ISSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 67, p. 763-780, 2020.

GROVER, A.; SHARMA, P. C. Development and use of molecular markers: past and present. **Critical reviews in biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 290-302, 2016.

GUSMÃO, E.; VIEIRA, F. A.; JÚNIOR, E. M. F. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.). **Cerne**, v. 12, n. 1, p. 84-91, 2006.

HAWERROTH, M. C. et al. Genetic variability among cashew hybrids and prediction of superior combinations based on agronomic performance. **Pesq. agropec. bras.**, v.54, p. 1-13, 2019.

IBGE. **Produção de Castanha-de-caju (cultivo)**. Disponível em:

<<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/castanha-de-caju-cultivo/br>>.

Acesso em: 09 de abril de 2023.

JESUS, O.N. et al. Recursos genéticos de Passiflora L. na Embrapa: pré-melhoramento e melhoramento genético. In: MORERA, M.P. et al. (Eds.) **Maracujá: dos recursos genéticos ao desenvolvimento tecnológico**. Brasília, DF: Pro Impress. 2018. p. 13-40.

JEYAVISHNU, K. et al. Increased revenue with high value-added products from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) addressing global challenges. **Food and Bioprocess Technology**, v. 14, p. 985-1012, 2021.

JOSÉ, S. C. B. R. et al. Conservação Ex Situ de Recursos Genéticos. In: PAIVA, S.R.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; SALOMÃO, A. N.; JOSÉ, S. C. B. R.; MOREIRA, J. R. A. (eds.). **Recursos genéticos: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019. 298 p.

LAYEK, U. et al. Assessment of yield enhancement in cashew (*Anacardium occidentale* L.) by the pollinator sharing effect of magnetic bee-friendly plants in India. **Acta Ecologica Sinica**, v. 41, n. 3, p. 243-252, 2021.

MELO, D. S. et al. **Hibridação artificial em cajueiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013. 8 p.

OLIVEIRA, J. S. et al. Recursos Genéticos e Caracterização Morfo-Agronômica. In: **Banco de germoplasma de Passiflora L. 'Flor da Paixão': caracterização fenotípica, diversidade genética, fotodocumentação e herborização**. FALEIRO, F. G. et al. (Eds.). Brasília, DF: Pro Impress, 2020. 140 p.

PAIVA, J. R.; CRISÓSTOMO J. R.; BARROS, L. M. **Recursos genéticos do cajueiro: coleta, conservação, caracterização e utilização**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003. 43 p.

PAIVA, S. R. et al. Caracterização de Recursos Genéticos. In: PAIVA, S.R.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; SALOMÃO, A. N.; JOSÉ, S. C. B. R.; MOREIRA, J. R. A. (eds.). **Recursos genéticos: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019. 298 p.

RAMALHO, A. B. et al. Diversidade genética entre genótipos de *Bertholletia excelsa* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Floresta**, v. 46, n. 2, p. 207-214, 2016.

SALAM, M.A.; PETER, K.V. **Cashew: A Monograph**, p. 257., India: Stadium press, 2010.

SALEHI, B. et al. Antioxidant, antimicrobial, and anticancer effects of *Anacardium* plants: an ethnopharmacological perspective. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 295, 2020.

SALOMÃO, A. N. et al. Recursos genéticos vegetais. In: PAIVA, S.R.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; SALOMÃO, A. N.; JOSÉ, S. C. B. R.; MOREIRA, J. R. A. (eds.). **Recursos genéticos: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019. 298 p.

SATYAKI, P. R. V.; GEHRING, M. Paternally acting canonical RNA directed DNA methylation pathway genes sensitize arabidopsis endosperm to paternal genome dosage. **Plant Cell**, v. 31, p. 1563–1578, 2019.

SEVILHA, A. C. et al. Conservação In Situ de Recursos Genéticos. In: PAIVA, S.R.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; SALOMÃO, A. N.; JOSÉ, S. C. B. R.; MOREIRA, J. R. A. (eds.). **Recursos genéticos: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019. 298 p.

SERRANO, L. A. L.; PESSOA, P. F. A. P. **Sistema de produção do caju: aspectos econômicos da cultura do cajueiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, jul 2016. 2 ed.

SOUZA, R. L. et al. Genetic variability revealed by microsatellite markers in a germplasm collection of *Jatropha curcas* L. in Brazil: an important plant for biofuels. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 19, p. 337-346, 2019.

THOMAS, T. D.; CHATURVEDI, R. Endosperm culture: a novel method for triploid plant production. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 93, p. 1–14, 2008.

TURCHETTO, C. et al. Marcadores genéticos baseados em DNA. In: **Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações**. ZOLET, A. C. T.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. (Org.). Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 181 p.

WADE, R. et al. Macroalgal germplasm banking for conservation, food security, and industry. **PLoS biology**, v. 18, n. 2, p. 1-10, 2020.

YOUNIS, A. et al. Molecular markers improve abiotic stress tolerance in crops: a review. **Plants**, v. 9, n. 10, p. 1374, 2020.

Capítulo 1: Metodologia não-destrutiva de extração de DNA a partir de semente do cajueiro.

1 INTRODUÇÃO

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma espécie vegetal nativa muito apreciada e utilizada pela população, devido aos seus diversos usos e benefícios, principalmente alimentares e medicinais (NOVAES; NOVAES, 2021). Além disso, possui importância socioeconômica, por ser fonte de emprego e renda para as famílias, principalmente no período de seca (BRAINER; VIDAL, 2021), sendo que a região do Nordeste se destaca como maior produtora, principalmente o estado do Ceará (IBGE, 2021). Devido a isso, é importante que os produtores e pesquisadores continuem ampliando a base genética dos materiais genéticos e desenvolvendo novas variedades (CZEMBOR et al., 2021).

A conservação e a caracterização de diferentes acessos em Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) são essenciais para conhecer a variabilidade genética das plantas, as características que carregam em si e que poderá facilitar o seu uso em programas de melhoramento genético (OLIVEIRA, et al., 2020). Conservar a diversidade genética das culturas agrícolas é importante para que se tenha base genética disponível (alelos) para possíveis adaptações que possam ser necessárias no futuro (BURLE, 2019).

A caracterização do material genético é feita por meio de descritores, que são baseados em características da planta, sendo eles: morfológicos, agrônômicos, fisiológicos, moleculares, dentre outros (FALEIRO, et al., 2020). Entretanto, a utilização de todos os descritores exige muito tempo e mão de obra para sua realização, sendo importante escolher somente aqueles que permitirão uma melhor avaliação do seu material e, conseqüentemente, a variabilidade dos acessos (OLIVEIRA, et al., 2020). A variabilidade genética pode ser estimada através dos marcadores moleculares baseados em PCR, como RAPD, ISSR e AFLP (PAIVA et al., 2019). Para realização da caracterização molecular, primeiramente deve ser feita a extração do DNA, a partir do material vegetal do indivíduo.

Em geral, a extração é realizada utilizando o tecido foliar. Porém, quando realizada a partir das sementes, permite que a caracterização molecular seja realizada independente da fase da planta e antes da semeadura, economizando tempo e espaço (VON POST et al., 2003). A partir disso, seria possível acelerar as análises genéticas de genótipos, caracterizar e eliminar sementes indesejáveis, antes de levá-las ao campo (MA et al., 2019). Mas para que o plantio de sementes previamente avaliadas e selecionadas seja possível, a

extração do material genético (DNA) tem que ser feita de forma não destrutiva (ZHENG et al., 2015). Além de tornar possível o envio das sementes devidamente avaliadas para outros lugares pois, diferente do tecido foliar, as sementes não precisam ser mantidas no gelo ou liofilizadas (VON POST et al., 2003) a fim de preservar a integridade do material genético.

Atualmente, a maior parte da conservação do cajueiro é feita por meio de plantas a campo e sob a forma de sementes em câmara fria (CASTRO, 2020). Entretanto, alguns acessos coletados só estão conservados sob a forma de sementes, pois são resultado de coletas em regiões distantes. Logo, desenvolver ou adaptar metodologias de extração de DNA diretamente da semente é fundamental. Estudos realizados em cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), buscando facilitar essa extração, podem simplificar e otimizar muitas etapas, permitindo a obtenção de resultados de forma mais rápida.

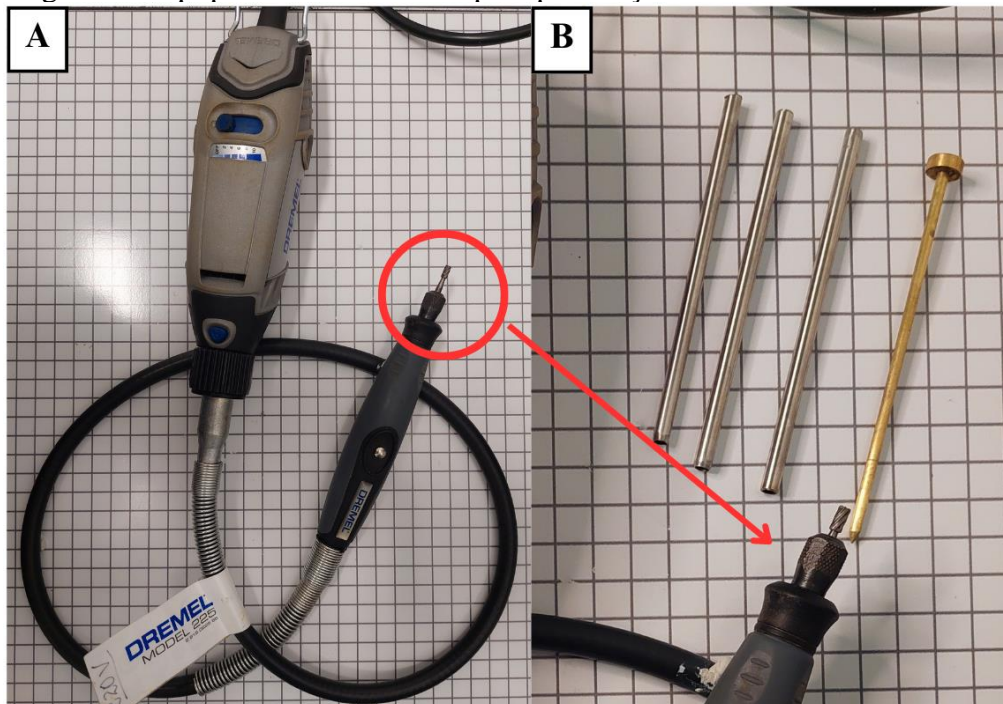
Dessa forma, esse estudo teve como objetivo desenvolver uma metodologia de extração de DNA, não destrutiva, a partir da semente do cajueiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do material

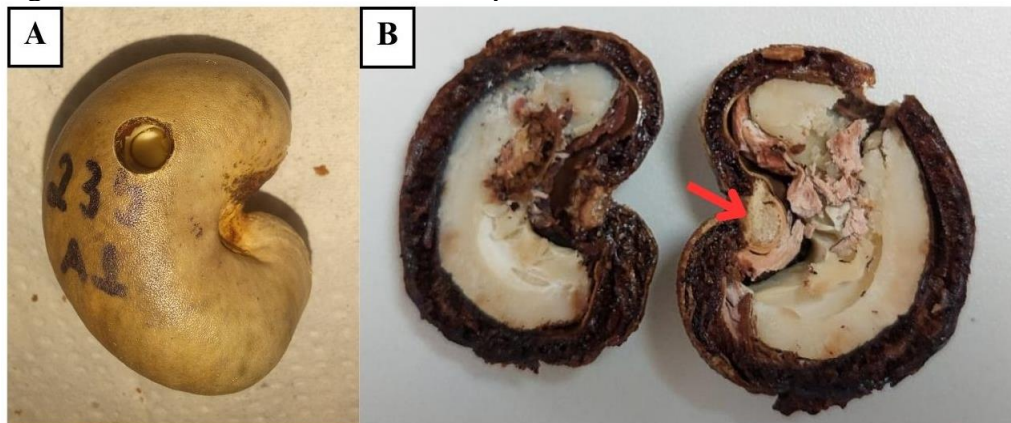
O material coletado foi utilizado para os testes de extração de DNA. As sementes utilizadas foram as do clone CCP 06 (safra 2022), pois apresentam elevado poder germinativo. As sementes foram perfuradas mecanicamente com auxílio de uma mini retífica (Figura 1A), da marca Dremel, na sua porção mais distal em relação à posição do embrião (Figura 2) com uma broca do tipo escariadora nº 194 (1/8 polegadas) até atingir o endosperma. Uma pequena amostra do endosperma (≥ 20 mg) foi coletada com um tubo de aço, previamente autoclavado, de 3 mm de diâmetro (Figura 1B) e imediatamente colocada no microtubo com o auxílio de um pino também de aço. Um novo tubo autoclavado foi utilizado para cada amostra.

Figura 1 - Equipamentos utilizados para perfuração das sementes.



A- Mini retífica; B- Tubo de aço e broca. A seta e círculo vermelho destaca a broca utilizada. Fonte: Bordallo (2023).

Figura 2 - Sementes do clone CCP 06 perfuradas.



1- Visão externa; 2- Visão interna. A seta vermelha indica a posição do embrião. Fonte: autora (2022).

2.2 Determinação de material selante e teste de germinação preliminar

Devido a abertura feita na castanha para retirada do endosperma, foram testados quatro materiais para selar essa região a fim de evitar a inviabilização da semente e permitir seu uso em plantios futuros. Para os testes preliminares, os materiais com propriedades selantes foram aplicados na região logo após a retirada do endosperma e da casca, sendo elas: 1) gel à base de quitosana (FILHO, 2021), 2) silicone, 3) cimento cola e 4) gesso (esses três últimos comerciais).

Quanto a preparação do selante a base de quitosana seguiu os seguintes passos: 1) preparo de solução com 10 ml de ácido acético PA (99,5% de pureza) e 90 ml de água destilada; 2) foi adicionado 1 ml de SPAN 80 (tensoativo) e 10 ml de glicerol; 3) a mistura foi aquecida a 80 °C sob agitação mecânica de 300 rpm e 5 gramas de quitosana foi adicionado lentamente até a completa dispersão desta com a formação de um gel; 4) o gel formado foi resfriado até 65 °C e a seguir, sob agitação de 300 rpm, foi adicionado 12 gramas de gelatina comercial bovina até sua completa dispersão e incorporação / solubilização no gel; 5) o gel foi resfriado até a temperatura ambiente (25-28 °C) e foi aplicado nos furos das castanhas com auxílio de uma seringa de 3 ml. O silicone foi aplicado aos furos com o próprio bico aplicador da bisnaga. O cimento cola e o gesso foram preparados de acordo com as instruções dos fabricantes e inseridos com auxílio de uma seringa de 3 ml.

Após a secagem dos selantes, conforme a indicação dos fabricantes, as sementes foram plantadas em bandejas com substrato comercial. Os testes preliminares consistiram na utilização de 10 sementes, perfuradas e não perfuradas (controle), em condições de telado, avaliadas uma vez por semana, pelo período de um mês. Para determinação do selante, foi

feita a comparação entre os materiais selantes utilizados, sendo escolhido aquele que não reduzisse drasticamente a quantidade de sementes que emergissem.

2.3 Teste de germinação definitivo

Recomenda-se que haja um treinamento prévio com o operador da mini retífica, para evitar a retirada de endosperma em excesso ou danos maiores na semente. Após a definição do selante com melhor potencial para vedar as sementes nos testes preliminares, foi realizado um teste de germinação com dois tratamentos: sementes perfuradas e seladas; sementes não perfuradas (sementes normais), com 100 repetições cada tratamento. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC). As sementes de cada tratamento foram semeadas em tubetes com substrato comercial e avaliadas uma vez por semana, pelo período de um mês, para quantificar a emergência das sementes. Os experimentos de germinação foram conduzidos no viveiro de produção de mudas da Embrapa Agroindústria Tropical, em Pacajus-CE. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, por meio do software Genes (CRUZ, 2016).

2.4 Extração de DNA da semente do clone CCP 06

Para a extração de DNA, foram testados cinco protocolos já publicados e três kits comerciais, sendo eles, respectivamente: Zheng et al. (2015), CTAB-PVP e WIZARD PVP propostas por Costa et al. (2015), Ahmad, Ferguson e Southwick (2003), Doyle e Doyle (1990), *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, WI, USA), *EasyPure Plant Genomic DNA kit* (TransGen, Beijing, China) e *Quick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit* (Zymo Research Corp., Orange, CA). Finalizadas as extrações, todos tiveram o DNA quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*) e o DNA bruto foi visualizado em gel de agarose a 0,8%. Destes, foram selecionados os métodos que conseguiram extrair DNA de qualidade suficiente para usos futuros.

2.5 PCR para verificar a viabilidade dos DNAs extraídos

A verificação da viabilidade dos DNAs extraídos do clone CCP 06 de cada protocolo foi feita por meio de reações de PCR usando 4 primers ISSR, sendo eles I826, I834, I840 e I846 (Tabela 1).

Tabela 1 - Primers ISSR utilizados em amplificações de DNA do clone CCP 06.

Primers ISSR	Sequência completa (5'-3')	Ta (°C)
I826	(AC) ₈ C	47.1
I834	(AG) ₈ YT	50.4
I840	(GA) ₈ YT	49.2
I846	(CA) ₈ RT	50.0

Ta = temperatura de anelamento. Y= C ou T; R = A ou G. Fonte: autora (2023).

As concentrações adotadas para um volume final de 20 µL, consistiram em: tampão da PCR 1X; MgCl₂ 2 mM; dNTP 0,2 mM; 1U Taq DNA polimerase, 0,8 µM de primer; 20 ng de DNA e água ultrapura para completar o volume final. Para as reações de PCR, as amostras foram amplificadas utilizando termociclador (*Applied Biosystems*, modelo Veriti 96-Well Thermal Cycler) nas etapas a seguir: (I) desnaturação inicial do DNA a 94 °C por 5 minutos, (II) realização de 40 ciclos a 94 °C por 1 minuto; anelamento durante 40 segundos a temperaturas específicas para cada primer (Tabela 1); extensão por 2 minutos a 72 °C; e (III) extensão final do DNA por 5 minutos a 72 °C.

2.6 Validação do protocolo em sementes de cajueiro do cerrado

Após a definição do protocolo que apresentou o melhor resultado para extração de DNA, essa metodologia foi então testada em cinco sementes do acesso BGC 676, coletadas no cerrado brasileiro (município de Campos Belos, Goiás). O DNA bruto foi quantificado em NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*) e visualizado em gel de agarose a 0,8%. Foi realizado uma PCR com um marcador do tipo ISSR para validação da metodologia.

Para verificar a viabilidade dos DNAs, foi realizado uma PCR com o primer I848 (Sequência completa 5'-3': (CA)₈RG). As concentrações adotadas para um volume final de 20 µL, consistiram em: tampão da PCR 1X; MgCl₂ 2 mM; dNTP 0,2 mM; 1U Taq DNA polimerase, 0,8 µM de primer; 20 ng de DNA e água ultrapura para completar o volume final. Para as reações de PCR, as amostras foram amplificadas utilizando termociclador (*Applied Biosystems*, modelo Veriti 96-Well Thermal Cycler) nas etapas a seguir: (I) desnaturação inicial do DNA a 94 °C por 5 minutos, (II) realização de 40 ciclos a 94°C por 1 minuto; anelamento durante 40 segundos a temperaturas específicas de 50,8 °C; extensão por 2 minutos a 72°C; e (III); extensão final do DNA por 5 minutos a 72 °C.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Comparação de selantes e teste preliminar de germinação

Após a realização dos testes preliminares, as sementes que não germinaram foram abertas para avaliação da parte interna. Foi visualizado a absorção excessiva de água o que levou ao apodrecimento das amêndoas (Figura 3). Por isso, aqueles selantes que se mostraram higroscópicos foram descartados, como o gel à base de quitosana e o silicone. Entre o gesso e cimento cola, este último foi o que levou a uma menor perda do potencial germinativo.

Figura 3 – Sementes perfuradas do clone CCP 06, inviáveis por excesso de água.



Fonte: autora (2022).

3.2 Teste de germinação definitivo

Obteve-se como resultado do teste de germinação, 60% de sementes perfuradas emergidas, comparando com 81% das sementes não perfuradas. Não foram observadas diferenças visuais e estruturais discrepantes entre as plantas produzidas a partir das sementes perfuradas das não perfuradas. Na análise de variância (Tabela 2), os resultados foram significativos, indicando que estatisticamente existe diferença, embora o percentual de germinação tenha sido acima de 50%. Isso mostra que ainda devem ser feitos estudos para desenvolver adaptações e melhorias para aumentar o percentual de germinação a níveis próximos das sementes não perfuradas.

Tabela 2 - Resumo da Análise de Variância: Quadrados médios (QM) e Coeficiente de variação (CV) para o teste de germinação.

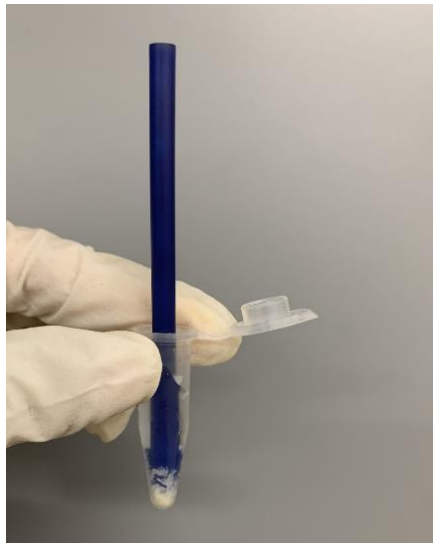
F.V	Teste de germinação
Tratamento	57,8**
CV%	19,2

** Significativo a 1% de probabilidade de erro pelo teste F. Fonte: autora (2023).

3.3 Preparação das amostras para extração de DNA

Algumas adaptações foram feitas nas metodologias a fim de melhorar os resultados como, por exemplo, armazenar o material coletado em ultrafreezer a -80°C para que este não oxidasse e se mantivesse molecularmente íntegro até o início da extração de DNA propriamente dita. Após alguns testes, decidiu-se não utilizar nitrogênio líquido nas amostras, pois dificultava a maceração devido ao congelamento e, conseqüentemente, endurecimento do material dentro do microtubo. As soluções de lise foram adicionadas diretamente no microtubo e a amostra macerada com auxílio de um pistilo de plástico autoclavado (Figura 4) para todos os protocolos e kits avaliados. Isso evita possíveis contaminações ou a perda do material durante a transferência do cadinho para o microtubo, no caso de maceração com nitrogênio líquido.

Figura 4 - Material sendo macerado com auxílio do pistilo.

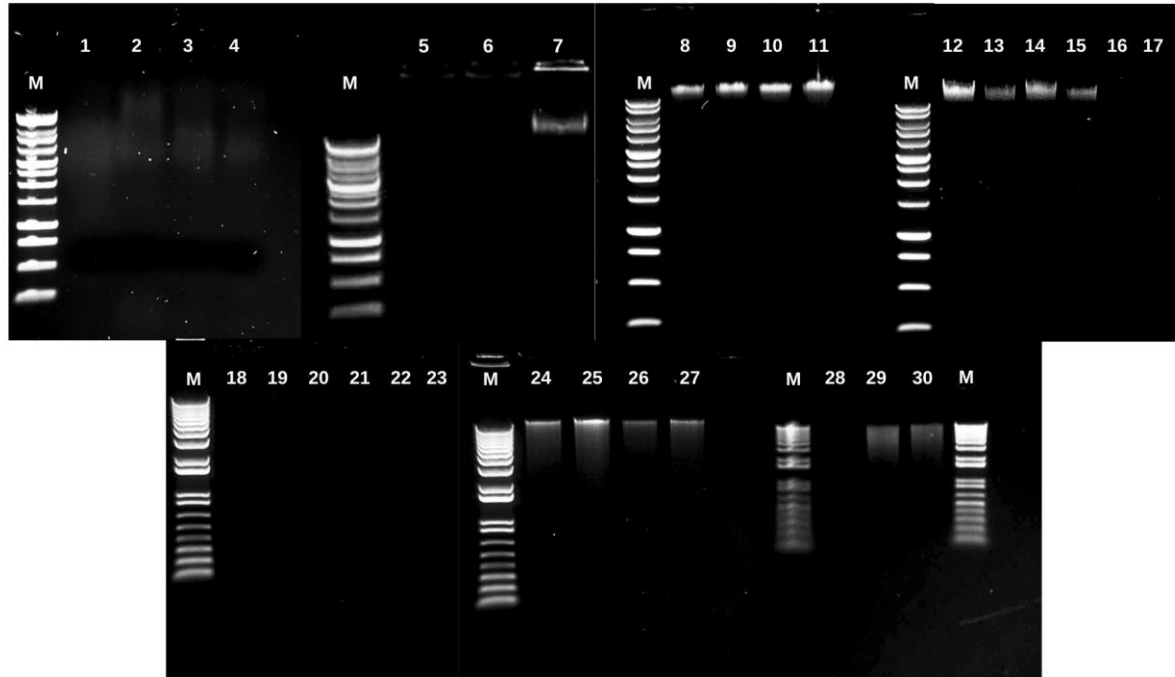


Fonte: autora (2023).

3.4 Extração de DNA do clone CCP 06

Em relação a extração de DNA de sementes de cajueiro do clone CCP 06, foi possível notar que as bandas se apresentaram-se mais definidas para os DNAs extraídos com kits, mesmo que na quantificação tenham se mostrado com baixa concentração, indicando uma melhor purificação (Figura 5 e Tabela 3).

Figura 5 – Gel de agarose mostrando o DNA bruto resultados dos protocolos e kits testados do clone CCP 06.



1-4. Zheng et al. (2015); 5-7. Doyle-Doyle (1990); 8-11. *Wizard Genomic DNA Purification* kit (Promega); 12-15. *Wizard PVP* - Costa et al (2015); 16-19. Ahmad, Ferguson e Southwick (2003); 20-23. CTAB-PVP – Costa et al. (2015); 24-27. *EasyPure Plant Genomic DNA* kit (TransGen); e 28-30. *Quick-DNA Plant/Seed Miniprep* Kit (Zymo). Os números em cada coluna do gel correspondem à identificação das sementes utilizadas. M. marcador de peso molecular de 1Kb. Fonte: autora (2023).

Tabela 3 - Quantificação e avaliação da qualidade do DNA do clone CCP 06 através do NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*).

ID	Concentração (ng/μl)	260/280	260/230	ID	Concentração (ng/μl)	260/280	260/230
01	217	0,92	0,31	16	19,6	0,95	0,43
02	336,4	1,33	0,44	17	19,9	1,01	0,22
03	310,7	1,46	0,49	18	43,2	0,91	1,07
04	151,4	1,51	0,49	19	21,6	1,2	0,35
05	52,5	1,73	0,69	20	22,3	2,16	2,33
06	301,2	1,86	1,07	21	6,9	2,88	-14,1
07	1074,8	1,55	0,54	22	21,4	2,01	1,89
08	722,4	1,38	0,54	23	10,0	1,77	2,83
09	209,7	1,75	0,95	24	7,4	2,86	0,2
10	83,2	1,2	0,44	25	2,5	3,65	1,64
11	392,3	0,9	0,21	26	49,1	1,57	0,77
12	190,5	1	0,27	27	9,0	1,55	1,24
13	50,3	1,25	0,38	28	6,6	-3,74	-0,6
14	75,5	1,08	0,28	29	7	-6,92	0,25
15	158	1,62	0,68	30	6,4	-3,14	-2,68

1-4. Zheng et al. (2015); 5-7. Doyle-Doyle (1990); 8-11. *Wizard Genomic DNA Purification* kit (Promega); 12-15. *Wizard PVP* - Costa et al (2015); 16-19. Ahmad, Ferguson e Southwick (2003); 20-23. CTAB-PVP – Costa et al. (2015); 24-27. *EasyPure Plant Genomic DNA* kit (TransGen); e 28-30. *Quick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit* (Zymo). Fonte: autora (2023).

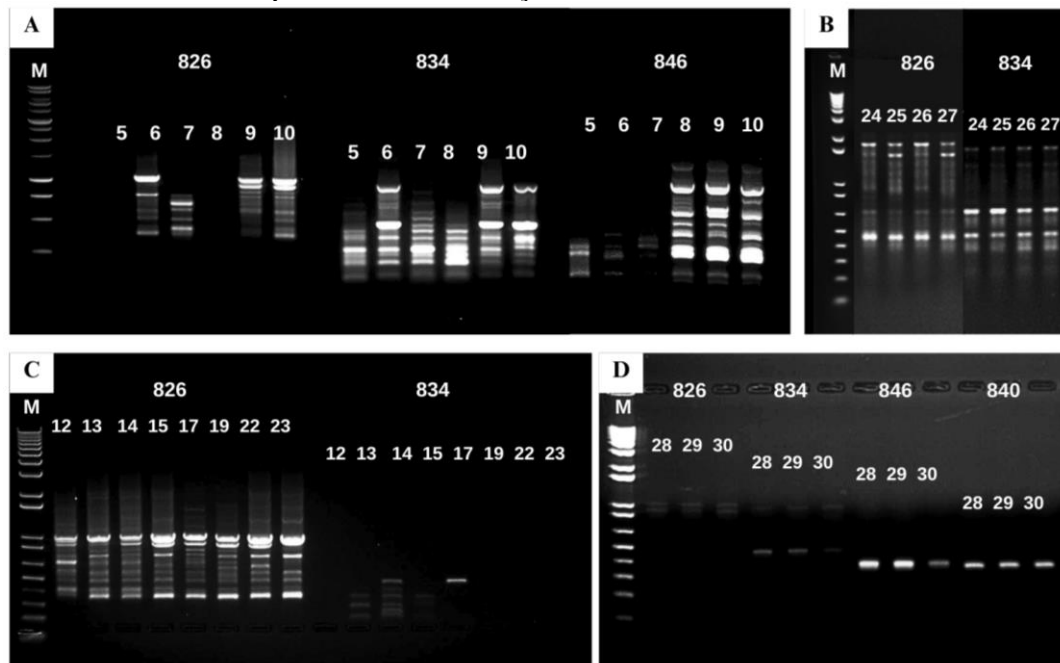
Essa variação na qualidade do DNA também é vista em outros trabalhos em que a extração do DNA foi realizada diretamente na semente, mas que não interferiu em análises com marcadores moleculares. Zheng et al. (2015), ao realizar a extração de DNA a partir da semente de algodão, utilizando o tecido dos cotilédones, relataram que ocorreram pequenas variações no rendimento dos DNAs extraídos, mas permitiam o seu uso em análises moleculares. Von Post et al (2003), desenvolveram um método de extração não destrutivo e rápido para sementes de cevada que também apresentou um DNA de não tão boa qualidade e pouco concentrado, mas que permitia o uso direto em análises de rotina em qualquer laboratório. Esses autores relataram que a partir da utilização desses métodos de extração pela

semente, é possível otimizar o tempo e trabalho, e a realização de extração de milhares de amostras ao dia.

3.5 PCR para verificar a viabilidade dos DNAs extraídos

Nos testes realizados em todas as amostras com primers ISSR, foi possível visualizar que as amplificações feitas com os DNAs extraídos por kits apresentaram os melhores resultados (Figura 6). Entretanto, a qualidade do DNA não foi muito boa, baseando-se nas razões 260/280 e 260/230 e no gel de agarose. Isso pode ser devido à presença de substâncias que são características de algumas plantas da família Anacardiaceae que apresentam alguma toxicidade, sendo eles flavonóides, especialmente biflavonóides, e lipídios fenólicos (CORREIA; DAVID; DAVID, 2006). A presença desses compostos pode interferir nas análises moleculares com marcadores baseados em PCR (SILVA, 2010), sendo outro fator que influencia na qualidade do resultado.

Figura 6 - Resultado da amplificação dos DNAs do clone CCP 06 com primers ISSR nos diferentes protocolos de extração testados.



A) 5-7. Doyle-Doyle (1990); 8-10. *Wizard Genomic DNA Purification* kit (Promega); B) 24-27. *EasyPure Plant Genomic DNA* kit (TransGen); C) 12-15. *Wizard PVP* - Costa et al (2015); 17-19. Ahmad, Ferguson e Southwick (2003); 22-23. CTAB-PVP – Costa et al. (2015); e D) 28-30. *Quick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit* (Zymo). M. marcador de peso molecular de 1Kb. Fonte: autora (2023).

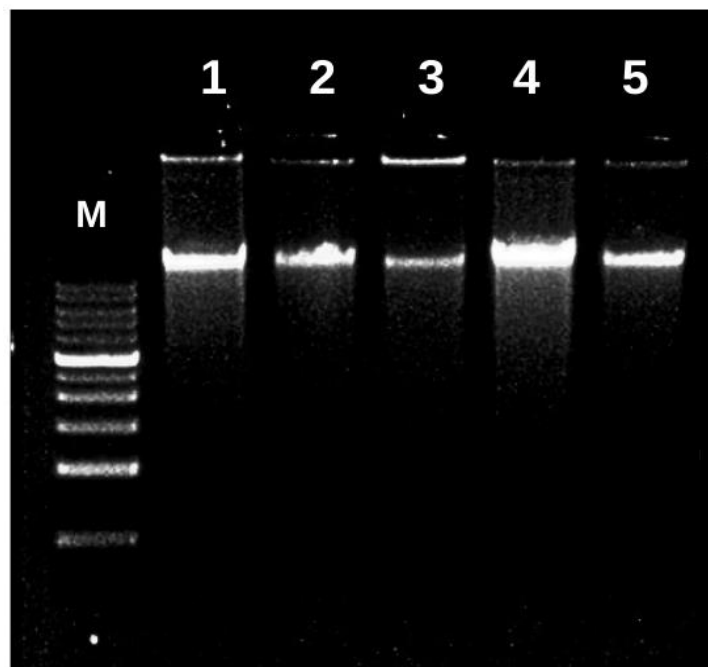
Dessa forma, os resultados indicam que o protocolo Doyle-Doyle (1990) e os kits comerciais *Wizard Genomic DNA Purification* kit (Promega) e *EasyPure Plant Genomic*

DNA kit (TransGen) apresentaram quantidade suficiente e qualidade aceitável de DNA que permitirão trabalhos futuros, como o uso em análises com marcadores moleculares, por exemplo. Há uma tendência na escolha pelos kits comerciais, uma vez que são mais rápidos e não é necessária a utilização de reagentes tóxicos como beta-mercaptoetanol e clorofórmio, além disso, deve ser considerado o custo/benefício.

3.6 Validação do protocolo de extração de DNA em sementes de cajueiro do Cerrado

Foi utilizado o *Wizard Genomic DNA Purification* kit (Promega) para extração do DNA do acesso BGC 676, sendo escolhido pelo melhor custo/benefício. A figura 7 e a tabela 4 mostram os resultados do DNA bruto e a quantificação, respectivamente, para as 5 amostras extraídas do acesso BGC 676. Foi possível visualizar as bandas de DNA para todas as amostras. A qualidade do DNA indicado pelas razões 260/280 e 230/260, também não foi um fator limitante para uso posterior com marcadores moleculares.

Figura 7 - Resultado da extração de DNA do acesso BGC 676 através do *Wizard Genomic DNA Purification* kit (Promega).



Os números em cada coluna do gel correspondem à identificação das sementes utilizadas. M. marcador de peso molecular de 1Kb. Fonte: autora (2023).

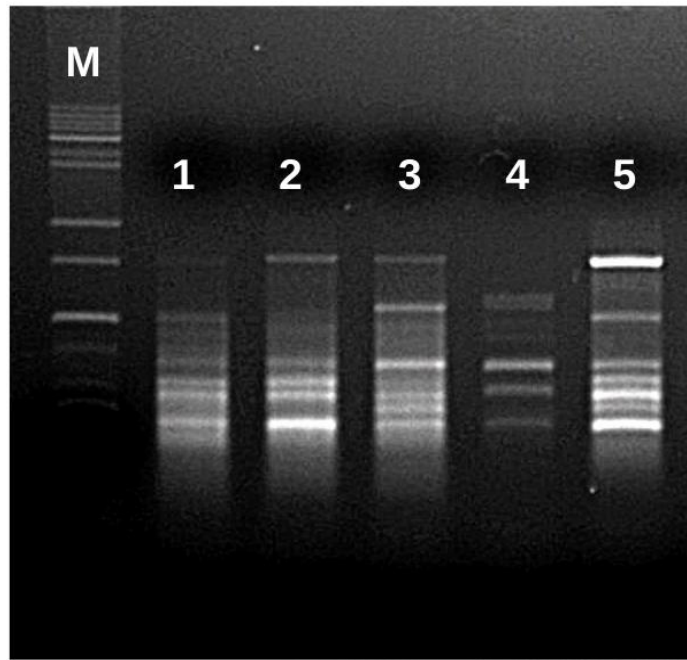
Tabela 4 - Quantificação de DNA do acesso BGC 676 através do NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*).

ID	Concentração (ng/μl)	260/280	260/230
01	157,7	1,81	1,6
02	137,6	1,77	1,56
03	118,9	1,58	0,8
04	111,5	1,68	1,24
05	65,2	1,71	1,24

Fonte: autora (2023).

O teste de viabilidade com esses DNAs foi realizado por meio de uma PCR com um marcador do tipo ISSR (I848). É possível observar que ocorreu amplificação em todas as amostras (Figura 8), indicando que o material pode ser utilizado para análises posteriores, como de divergência genética por exemplo.

Figura 8 - Resultado da amplificação dos DNAs do acesso BGC 676, com primer ISSR 848, para validação da metodologia de extração.



Os números em cada coluna do gel correspondem à identificação das sementes utilizadas. M. marcador de peso molecular de 1Kb. Fonte: autora (2023).

4 CONCLUSÃO

A metodologia técnica-científica desenvolvida é eficaz em extrair DNA de cajueiro a partir do endosperma. Os kits comerciais *Wizard Genomic DNA Purification* kit (Promega) e *EasyPure Plant Genomic DNA* kit (TransGen), foram superiores aos demais quanto ao uso desse DNA com marcadores ISSR baseados em PCR. O cimento cola foi o selante que apresentou os melhores resultados, possibilitando em um maior número de sementes germinadas dentre as perfuradas.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, R.; FERGUSON, L.; SOUTHWICK, S. M. Identification of pistachio (*Pistacia vera* L.) nuts with microsatellite markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 128, n. 6, p. 898-903, 2003.
- BRAINER, M. S. C. P.; VIDAL, M. F. **Cajucultura Nordestina em recuperação**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, ano 3, n. 54, nov. 2021.
- BURLE, M. L. Conservação de recursos genéticos vegetais na Embrapa—histórico e perspectivas futuras. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019. 14 p.
- CASTRO, A. C. R. Banco Ativo de Germoplasma de Cajueiro: Embrapa Agroindústria Tropical. In: **Bancos e coleções de germoplasma da Embrapa: conservação e uso**. PÁDUA, J. G.; ALBUQUERQUE, M. S.M.; MELO, S. C. M. (Eds.). Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2020. 167 p.
- CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, p. 1287-1300, 2006.
- COSTA, J. et al. Tracing tree nut allergens in chocolate: A comparison of DNA extraction protocols. **Food Chemistry**, v. 187, p. 469-476, 2015.
- CRUZ, C.D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Sci Agron**, v. 38, n. 4, p. 547-552, 2016.
- CZEMBOR, E et al. DArT-based evaluation of soybean germplasm from Polish Gene Bank. **BMC Research Notes**, v. 14, n. 1, p. 1-6, 2021.
- DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- FALEIRO, F. G. et al. O Gênero Passiflora: diversidade, conservação e uso. In: **Banco de germoplasma de Passiflora L. 'Flor da Paixão': caracterização fenotípica, diversidade genética, fotodocumentação e herborização**. FALEIRO, F. G. et al. (Eds.). Brasília, DF: Pro Impress, 2020. 140 p.
- FILHO, S. M. S. M. Embrapa Agroindústria Tropical (Comunicação Pessoal). 2021.
- IBGE. **Produção de Castanha-de-caju (cultivo)**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/castanha-de-caju-cultivo/br>>. Acesso em: 09 de abril de 2023.
- MA, Z. et al. Um método de extração de DNA novo, inofensivo e de alto teor de endosperma para o trigo. **Ciência Rural**, v. 49, n. 9, p. 1-10, 2019.
- NOVAES, T. E. R.; NOVAES, A. S. R. Análise dos potenciais medicinais do cajueiro (*Anacardium occidentale* Linn): uma breve revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. 1-7, 2021.

PAIVA, S. R. et al. Caracterização de Recursos Genéticos. In: PAIVA, S.R.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; SALOMÃO, A. N.; JOSÉ, S. C. B. R.; MOREIRA, J. R. A. (eds.). **Recursos genéticos: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019. 298 p.

OLIVEIRA, J. S. et al. Recursos Genéticos e Caracterização Morfo-Agronômica. In: **Banco de germoplasma de Passiflora L. 'Flor da Paixão': caracterização fenotípica, diversidade genética, fotodocumentação e herborização**. FALEIRO, F. G. et al. (Eds.). Brasília, DF: Pro Impress, 2020. 140 p.

SILVA, M.N. Extração de DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do cerrado. **Revista Árvore**, v. 34, n. 6, p. 973-978, 2010.

VON POST, R. et al. A high-throughput DNA extraction method for barley seed. **Euphytica**, v. 130, p. 255-260, 2003.

ZHENG, X. et al. Non-destructive high-throughput DNA extraction and genotyping methods for cotton seeds and seedlings. **Biotechniques**, v. 58, n. 5, p. 234-243, 2015.

Capítulo 2: Diversidade genética de acessos de cajueiro do Cerrado.

1 INTRODUÇÃO

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), é uma árvore tropical (DAO et al., 2022) e de origem brasileira, resistente a condições adversas, apresentando como característica a sobrevivência durante os períodos de seca do ano (JEYAVISHNU et al., 2021). Essa característica é de grande importância socioeconômica, pois a colheita ocorre na entressafra de outras culturas, além dessa produção ser feita por pequenos produtores, contribuindo na geração de renda e permanência das famílias no campo (ALMEIDA et al., 2017). O Brasil possui cerca de 427,1 mil hectares plantados com cajueiro, cuja produção de castanha é de 111,103 toneladas (IBGE 2021), estando concentrada, principalmente no Nordeste (BRAINER; VIDAL, 2021).

Devido a essa importância socioeconômica, estudos realizados com o cajueiro são muito importantes, principalmente aqueles que visam caracterizar a variabilidade genética. O cajueiro é uma planta principalmente alógama, com alto grau de heterozigose, possuindo grande variabilidade nas populações naturais (PAIVA; CRISÓSTOMO; BARROS, 2003). Além disso, o Cerrado possui grande diversidade genética, representando 30% de toda a flora natural do Brasil, sendo que muitas espécies, principalmente as frutíferas, possuem ampla variabilidade de cores, formatos, aromas, dentre outros (DANTAS et al., 2019).

Por isso, é necessário que seja feita a caracterização e avaliação desses materiais genéticos, pois é importante conhecer a variabilidade do material (OLIVEIRA et al., 2020; FALEIRO et al., 2020) e, a partir dessas informações, planejar as técnicas de conservação e de uso (WADE, et al., 2020).

A caracterização do material é feita por meio de descritores da planta (FALEIRO, et al., 2020). Dentre eles, tem-se os descritores morfológicos, que são os mais utilizados na caracterização e quantificação da diversidade genética em cajueiros (CARNEIRO et al., 2019). Nos descritores morfológicos, tem-se a biometria, que pode ser feita em frutos ou sementes, e permite identificar a variabilidade genética dentro de uma mesma espécie (GUSMÃO; VIEIRA; JÚNIOR, 2006).

Além disso, também é possível utilizar os descritores moleculares na caracterização de germoplasma, pois eles se destacam como uma ferramenta a mais, que permite avaliar e conhecer a variabilidade genética (SOUZA et al., 2019). Nesse tipo de caracterização, a diversidade genética é avaliada sem interferência do ambiente ou do fenótipo

(SINGH et al., 2017). Existem vários tipos de marcadores moleculares, mas para estimativa da variabilidade e diversidade genética, os marcadores dominantes e universais como RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) e ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*) podem ser úteis (PAIVA et al., 2019).

Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de acessos de cajueiro do cerrado, por meio de dados biométricos das sementes e marcadores moleculares do tipo RAPD e ISSR.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Diversidade genética por meio da biometria das sementes

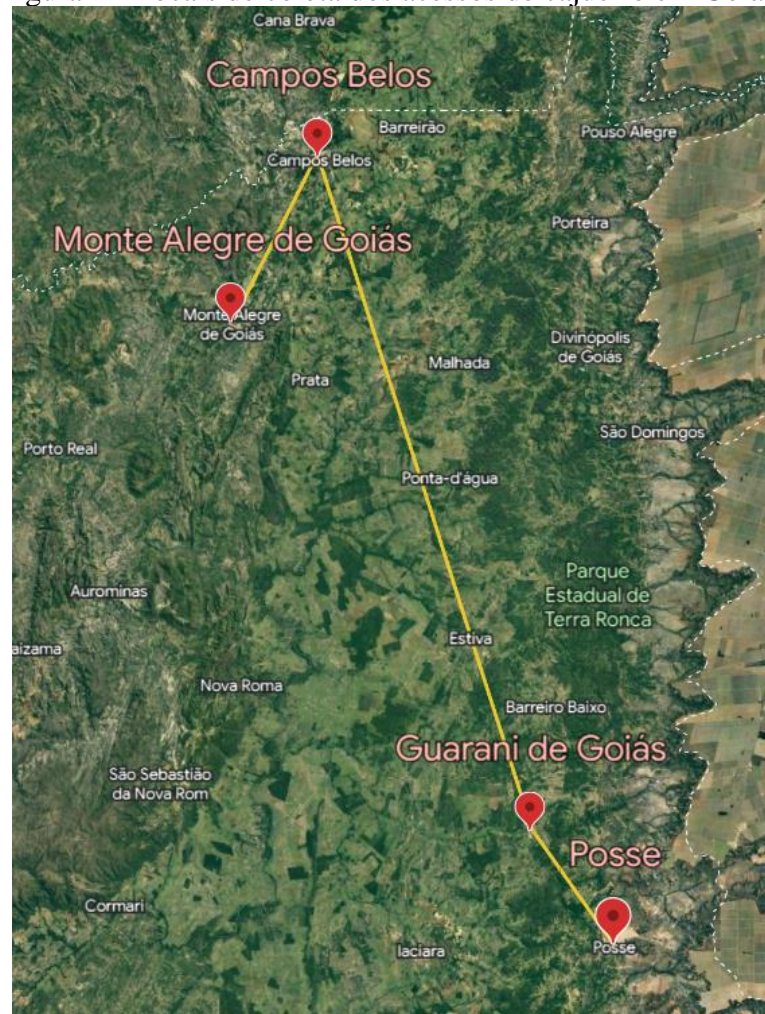
As sementes avaliadas fazem parte do acervo do BAG-Caju, da Embrapa Agroindústria Tropical, obtidas a partir de coletas de populações nativas de cajueiro do cerrado (Estado de Goiás) (Figura 1). Para esse estudo, foi realizada a biometria (comprimento, largura e espessura) das sementes de sete acessos (Tabela 1 e Figura 2). Cada árvore foi considerada um tratamento (Figura 3) e para cada indivíduo foi coletada a biometria de 10 sementes, escolhidas ao acaso, por meio de um paquímetro digital, em milímetros.

Tabela 1 - Acessos de cajueiro do Cerrado (Estado de Goiás).

Coleção	Município	Ambiente	Quantidade de árvores por acesso
BGC 668	Posse	Cerrado Rupestre	4
BGC 669	Guarani de Goiás	Cerrado Típico	5
BGC 671	Guarani de Goiás	Cerrado Denso	4
BGC 672	Monte Alegre de Goiás	Pastagem	3
BGC 673	Monte Alegre de Goiás	Cerrado antropizado	3
BGC 676	Campos Belos	Cerrado antropizado	4
BGC 678	Campos Belos	Cerrado Típico	4

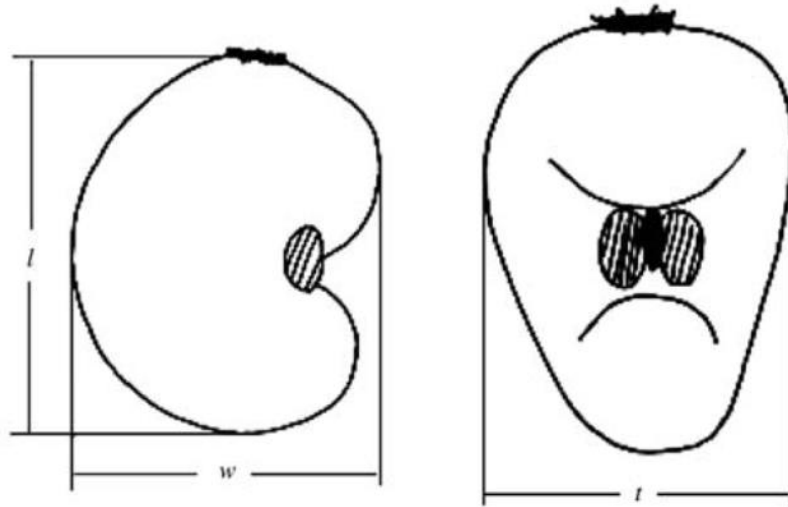
Fonte: autora (2023).

Figura 1 - Locais de coleta dos acessos de cajueiro em Goiás.



Fonte: Google Earth, 2023.

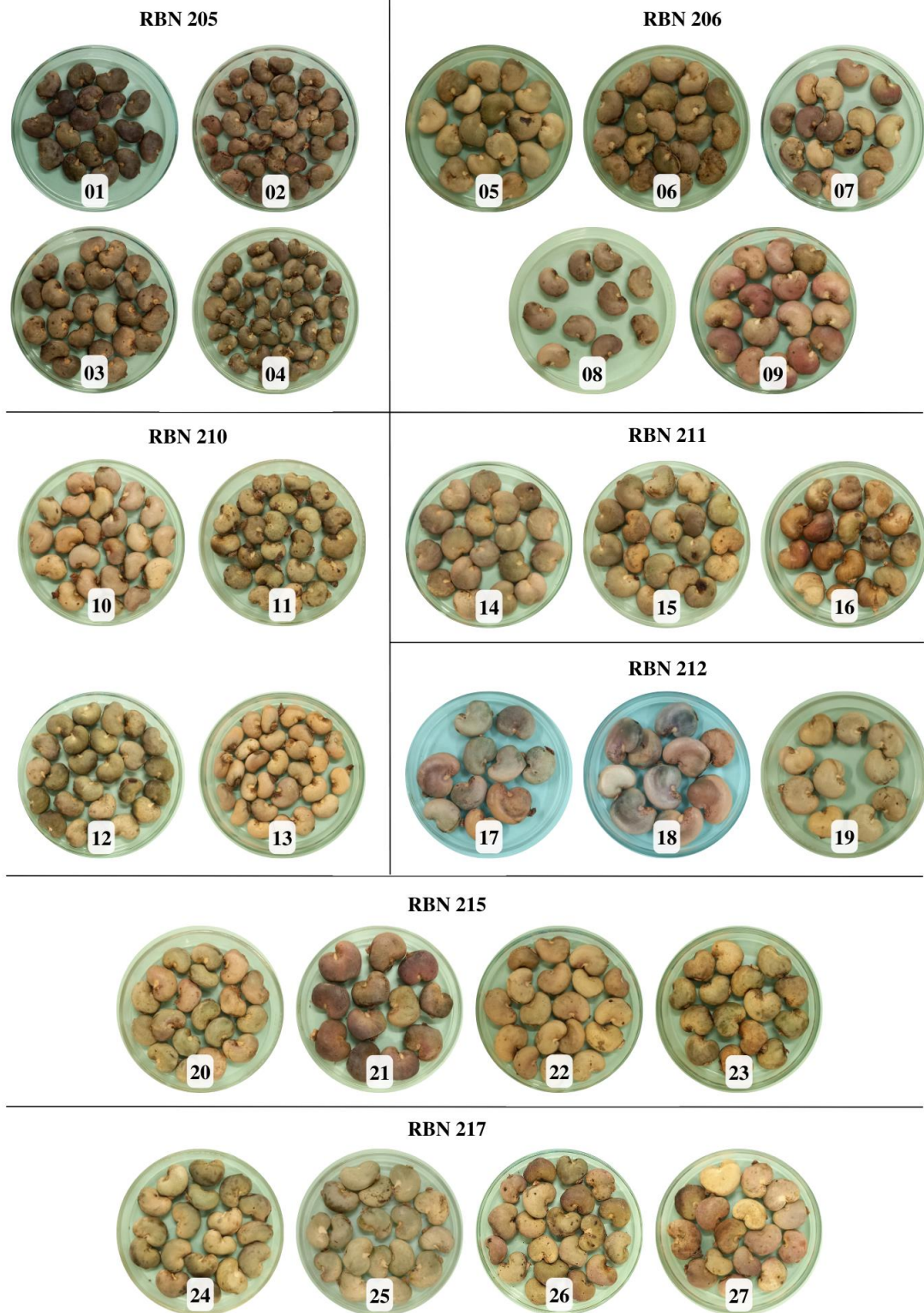
Figura 2 – Dimensões da castanha quanto a medidas de comprimento (l), largura (w) e espessura (t).



Fonte: Adaptado de Ogunsina (2013).

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo critério de Scott-Knott ($p < 0,05$). A partir do método de Singh (1981), foram quantificados os caracteres que mais contribuíram para a dissimilaridade genética entre os indivíduos avaliados. Utilizando a distância generalizada de Mahalanobis (D^2), foi realizada a análise de agrupamento pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*) e o de otimização de Tocher. O dendrograma foi construído pelo método UPGMA e o corte realizado seguindo o critério de Mojena (1977). Além disso, o coeficiente de correlação cofenética (CCC) do dendrograma foi estimado para validar o método de agrupamento. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software Genes (CRUZ, 2016).

Figura 3 – Sementes de cada árvore de cada acesso de cajueiro do cerrado.



Fonte: autora (2023).

2.2 Diversidade genética baseada em marcadores moleculares

A extração do DNA foi feita com o *Wizard Genomic DNA Purification Kit*

(Promega, Madison, WI, USA) nas sementes do acesso BGC 676, para o estudo de diversidade genética baseado em marcadores moleculares do tipo RAPD e ISSR. Foram selecionadas aleatoriamente cinco sementes das quatro árvores desse acesso, totalizando 20 amostras.

Os testes de amplificação do DNA foram inicialmente realizados com 26 primers RAPD e 30 primers ISSR. Destes, foram selecionados apenas os primers que apresentaram polimorfismo. O resultado da PCR para ambos os marcadores, foi analisado em gel de agarose 1% e submetido à eletroforese horizontal, com uma tensão de 110 V por 60 minutos. A visualização dos resultados, após a eletroforese, foi realizada em fotodocumentador L-PIX Chemi (Loccus) para as análises posteriores.

2.2.1 Condições da PCR

Para os primers RAPD as concentrações adotadas para um volume final de 13 μ L, consistiram em: tampão PCR 1X; $MgCl_2$ 2 mM; dNTP 0,2 mM; 1,0 U Taq DNA polimerase (Promega), 0,3 μ M de primer; 50 ng de DNA e água ultrapura para completar o volume final. Para as reações de PCR, as amostras foram amplificadas utilizando termociclador (*Applied Biosystems*, modelo Veriti 96-Well Thermal Cycler) nas etapas a seguir: (I) desnaturação prévia do DNA a 94 °C por 5 minutos, (II) realização de 40 ciclos a 94 °C por 1 minuto; anelamento durante 1 minuto a 35 °C; extensão por 2 minutos a 72°C; e (III) extensão final do DNA por 2 minutos a 72 °C.

Para os primers ISSR as concentrações adotadas para um volume final de 20 μ L, consistiram em: tampão PCR 1X; $MgCl_2$ 2 mM; dNTP 0,2 mM; 1,0 Taq DNA polimerase, 0,8 μ M de primer; 20 ng de DNA e água ultrapura para completar o volume final. Para as reações de PCR, as amostras foram amplificadas utilizando termociclador (*Applied Biosystems*, modelo Veriti 96-Well Thermal Cycler) nas etapas a seguir: (I) desnaturação prévia do DNA a 94 °C por 5 minutos, (II) realização de 40 ciclos a 94 °C por 1 minuto; anelamento durante 40 segundos (variando de 44 °C – 62 °C, de acordo com o primer); extensão por 2 minutos a 72 °C; e (III) extensão final do DNA por 5 minutos a 72 °C.

2.2.2 Análises estatísticas

Para as análises dos dados moleculares, a matriz com os dados binários foi construída a partir das bandas dos marcadores moleculares visualizados no gel, em que foi

avaliada a presença (1) e ausência (0) de bandas. As matrizes de distâncias genéticas foram construídas pelo complemento aritmético do coeficiente de Jaccard. A partir das matrizes, foi realizada a análise de agrupamento pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*) e o de otimização de Tocher. Os dendrogramas foram construídos pelo método de UPGMA e o corte foi realizado seguindo o critério de Mojena (1977). O coeficiente de correlação cofenética (CCC) de cada dendrograma (RAPD, ISSR e conjunta RAPD+ISSR) foi estimado para a validação do método de agrupamento. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software Genes (CRUZ, 2016).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Diversidade genética das sementes por dados biométricos.

Foi possível observar, a partir dos dados biométricos das sementes, diferenças para o comprimento, espessura e largura (Tabela 2). Para a variável comprimento, ocorreu uma variação de 14,2 mm a 26,0 mm, sendo separadas em sete grupos. A largura, variou de 11,2 mm a 21,9 mm, sendo separadas em oito grupos. A espessura, variou de 7,8 mm a 11,0 mm, sendo separadas em seis grupos. As sementes das árvores 18 e 4, destacam-se por apresentar o maior e menor valor de comprimento e de largura, respectivamente. No geral, as maiores sementes foram as do acesso BGC 672 e as menores foram do acesso BGC 668.

Essa variação na biometria das sementes, pode ser devido ao fato de, naturalmente, existir grande variabilidade no tamanho das sementes de árvores tropicais (CRUZ; CARVALHO, 2003).

Tabela 2 - Médias do comprimento (COMP), largura (LARG) e espessura (ESP) da semente, de 27 indivíduos/árvores de cajueiro.

ID	COMP	LARG	ESP	ID	COMP	LARG	ESP
1	18,6e	13,9g	7,8f	15	18,7e	18,4c	10,7b
2	15,2g	13,4g	8,7e	16	17,8f	18,8c	10,1c
3	17,8f	16,0e	8,7e	17	23,8b	20,3b	11,0a
4	14,2g	11,2h	7,5f	18	26,0a	21,9a	10,5b
5	19,6d	17,2d	9,6d	19	21,8c	20,6a	10,4c
6	20,2d	17,6d	10,6b	20	20,3d	17,8d	11,0a
7	19,7d	16,7e	9,2d	21	23,6b	20,6b	11,0a
8	18,9e	15,4f	8,4e	22	21,6	17,8d	9,7c
9	20,6d	18,6c	9,8c	23	19,5d	19,1c	11,3a
10	17,2f	15,3f	8,7e	24	20,2d	18,2c	9,4d
11	15,4g	16,3e	8,9e	25	20,7d	19,1c	9,1d
12	17,5f	15,3f	10,0c	26	18,1f	18,4c	10,1c
13	15,4g	15,1f	8,9e	27	19,6d	18,1d	10,3c
14	19,6d	18,5c	9,2d				

* Médias seguidas pelas mesmas letras (na coluna) pertencem ao mesmo grupo pelo critério de Scott-Knott a 5% de significância. Os números correspondem à identificação das árvores de cada acesso. 1-4: BGC 668; 5-9: BGC 669; 10-13: BGC 671; 14-16: BGC 672; 17-19: BGC 673; 20-23: BGC 676; 24-27: BGC 678. Fonte: autora (2023).

Por meio do método de Singh (Tabela 3), observa-se que as variáveis que mais contribuíram para a divergência foram o comprimento (31,7%) e a largura (50,5%). Isso pode ser comprovado visualmente, quando se observa as sementes ao do lado da outra (Figura 4). Dessa forma, a espessura foi a variável com menor contribuição (17,8%), podendo ser descartada em estudos posteriores, otimizando tempo e custos nas análises (GRIGOLO et al., 2018).

Tabela 3 – Contribuição relativa para divergência das variáveis avaliadas em 27 indivíduos/árvores de cajueiro do Cerrado, por meio da metodologia de Singh (1981).

Variável	Valor %
Comprimento	31,7
Largura	50,5
Espessura	17,8

Fonte: autora (2023).

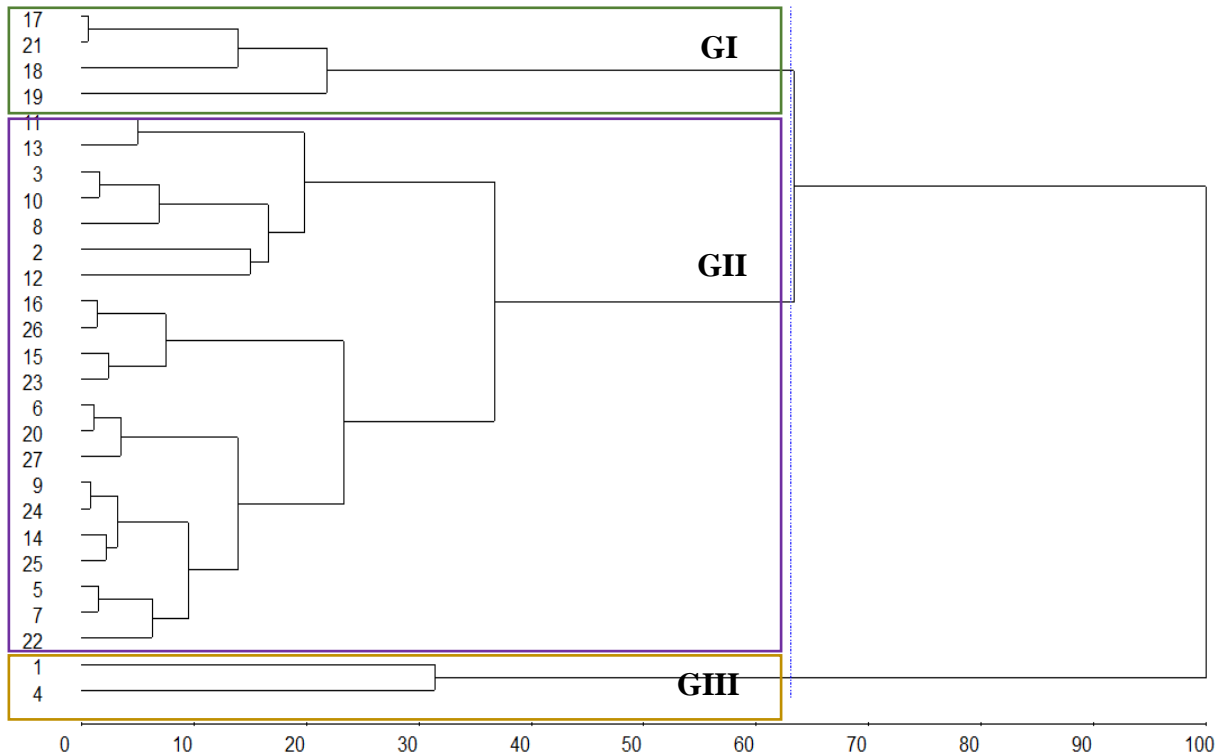
Figura 4 – Sementes de cada árvore dos acessos de cajueiro do Cerrado apresentando as diferenças biométricas.



Os números correspondem à identificação das árvores de cada acesso. 1-4: BGC 668; 5-9: BGC 669; 10-13: BGC 671; 14-16: BGC 672; 17-19: BGC 673; 20-23: BGC 676; 24-27: BGC 678. Fonte: autora (2023).

A partir da distância de Mahalanobis (D^2), foi construído o dendrograma utilizando o método UPGMA, sendo formado três grupos principais (Figura 5). O primeiro grupo é composto apenas pelas árvores 17, 21, 18 e 19. O segundo grupo, é formado pela maioria das árvores de diferentes acessos, sendo eles 11, 13, 3, 10, 8, 2, 12, 16, 26, 15, 23, 6, 20, 27, 9, 24, 14, 25, 5, 7 e 22. O terceiro grupo é composto apenas pelas árvores 1 e 4.

Figura 5 – Dendrograma de dissimilaridade genética (UPGMA) com os 27 indivíduos/árvores de cajueiro do Cerrado, obtido por meio da distância generalizada de Mahalanobis (D^2), estimado com base nos caracteres biométricos das sementes.



A linha vertical azul indica o ponto de corte a 67%, seguindo o critério de Mojena (1977). Os números correspondem à identificação das árvores de cada acesso. 1-4: BGC 668; 5-9: BGC 669; 10-13: BGC 671; 14-16: BGC 672; 17-19: BGC 673; 20-23: BGC 676; 24-27: BGC 678. Fonte: autora (2023).

No primeiro grupo, as árvores agrupadas pertencem ao mesmo acesso (BGC 673), exceto o 21, e foram os que apresentaram os maiores valores dos caracteres de biometria avaliados, principalmente de largura (Tabela 2). O segundo grupo, indica que as sementes das árvores avaliadas são bastante similares, mostrando que mesmo que haja diferenças biométricas (Tabela 2), elas não foram suficientes para distingui-los. No terceiro grupo formado, as árvores pertencem ao mesmo acesso (BGC 668), e foram os que apresentaram os menores valores para largura e comprimento de semente.

A correlação cofenética do dendrograma, apresentou valor significativo para o método de 0,66 ($P < 0,01$), pelo teste t. Conceição et al (2014) afirma que valores de CCC entre 0,60 e 0,80, podem ser devido ao pequeno número de variáveis utilizadas. Patto et al. (2004), obteve coeficiente cofenético de 0,61 e 0,62 e significativo, sendo considerado bons valores para os ajuste nas análises de agrupamento. A partir disso, os resultados dos coeficientes cofenéticos dos dendrogramas formados com os marcadores, são valores aceitáveis, tendo em vista que foram significativos.

Na análise de agrupamento por meio do método de otimização de Tocher, ocorreu

a separação das árvores em oito grupos (Tabela 4). No grupo I, ficaram agrupadas as árvores 17, 21 e 18. O grupo II, as árvores 9, 24, 14, 25, 5, 7, 22, 27, 6 e 20. O grupo III, as árvores 16, 26, 15 e 23. O grupo VI, as árvores 3, 10, 8, 12, 13 e 2. Os grupos V, VI, VII e VIII, apresentaram apenas uma árvore, sendo elas 11, 1, 4 e 19, respectivamente.

Tabela 4 – Formação de grupos de indivíduos/árvores estabelecidos pelo método de Tocher, com base na distância generalizada de Mahalanobis (D^2).

Grupos	INDIVÍDUOS
I	17, 21 e 18
II	9, 24, 14, 25, 5, 7, 22, 27, 6 e 20
III	16, 26, 15 e 23
IV	3, 10, 8, 12, 13 e 2
V	11
VI	1
VII	4
VIII	19

Os números correspondem à identificação das árvores de cada acesso. 1-4: BGC 668; 5-9: BGC 669; 10-13: BGC 671; 14-16: BGC 672; 17-19: BGC 673; 20-23: BGC 676; 24-27: BGC 678. Fonte: autora (2023).

De acordo com o método de Tocher, as sementes das árvores 11, 1, 4 e 19, são os que apresentam maior divergência. Isso é devido ao método manter a homogeneidade dentro dos grupos e a heterogeneidade entre os grupos; os indivíduos agrupados indicam maior similaridade e aqueles que estiverem nos últimos grupos, indicam maior divergência em relação aos indivíduos agrupados nos primeiros grupos (CORREA et al., 2021).

Ao comparar os agrupamentos obtidos pelos métodos de UPGMA e Tocher percebem-se resultados similares, mas o método de Tocher separou as árvores em mais grupos, apresentando maior discriminação. As árvores 17, 18 e 21, ficaram agrupados em ambos os métodos de agrupamento. No caso do método de UPGMA, ocorreu a formação de um grande grupo (GII), contendo a maioria das árvores e no método de Tocher, essas mesmas árvores foram distribuídos em três grupos diferentes (II, III e IV).

O método UPGMA, é mais detalhado, sendo possível visualizar as distâncias entre cada indivíduos nos grupos e os mais similares dentro do grupo. Isso complementa os resultados obtidos pelo método de Tocher, que mostrou os grupos mais distintos. Portanto, os resultados obtidos, por meio dos métodos de UPGMA e de Tocher, indicam variabilidade genética nos acessos de cajueiro.

Além disso, essa variabilidade encontrada entre e dentro dos acessos, pode estar relacionada ao fato de que essas sementes foram coletadas em populações naturais, em que não se tem controle da época do semeio, polinização e agentes polinizadores, dispersão das sementes e outros fatores. Por isso, é importante a realização de estudos que envolvam populações naturais do cajueiro, para que o uso e conservação desses materiais seja feito de forma eficiente.

3.2 Diversidade genética baseada em marcadores moleculares

A diversidade genética molecular do acesso BGC 676 de cajueiro foi avaliada usando 10 primers RAPD e ISSR cada. Esse acesso foi escolhido devido a diferenças em aspectos quantitativos e qualitativos da semente, principalmente cor, tamanho e formato. Ambos os marcadores foram previamente testados para a seleção daqueles que apresentavam polimorfismo, sendo testados inicialmente 26 primers RAPD e 30 primers ISSR. Foram obtidas para os marcadores RAPD e ISSR o total 29 e 33 bandas, com 17 (58,32%) e 21 (62,64%) bandas polimórficas, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 - Lista de primers polimórficos RAPD e ISSR selecionados em ampliações de DNA do acesso BGC 676.

Primers RAPD	Sequência completa (5'-3')	Ta (°C)	TB	BP	P (%)
OPA-05	AGGGGTCTTG	35	4	3	75,0
OPA-08	GTGACGTAGG	35	2	1	50,0
OPA-09	GGGTAACGCC	35	4	3	75,0
OPC-20	ACTTCGCCAC	35	4	2	50,0
OPD-20	ACCCGGTCAC	35	3	2	66,6
OPF-12	ACGGTACCAG	35	2	1	50,0
OPG-10	AGGGCCGTCT	35	3	1	33,3
OPN-03	GGTACTCCCC	35	2	1	50,0
OPN-06	GAGACGCACA	35	2	2	100,0
OPL-08	AGCAGGTGGA	35	3	1	33,3
Total		--	29	17	58,32
Primers ISSR	Sequência completa (5'-3')	Ta (°C)	TB	BP	P (%)
I01	(GACA) ₄	61.0	3	2	66,6
I02	(GAAGTGGG) ₂	62.0	3	1	33,3
I05	(TCC) ₅	57.0	2	1	50,0
I818	(CA) ₈ G	50.0	3	2	66,6
I823	(TC) ₈ T	44.7	4	2	50,0
I834	(AG) ₈ YT	50.4	3	2	66,6
I836	(AG) ₈ YA	50.0	5	3	60,0
I842	(GA) ₈ YG	50.0	3	1	33,3
I848	(CA) ₈ RG	50.8	4	4	100,0
I881	(GGGTG) ₃	55,3	3	3	100,0
Total		--	33	21	62,64

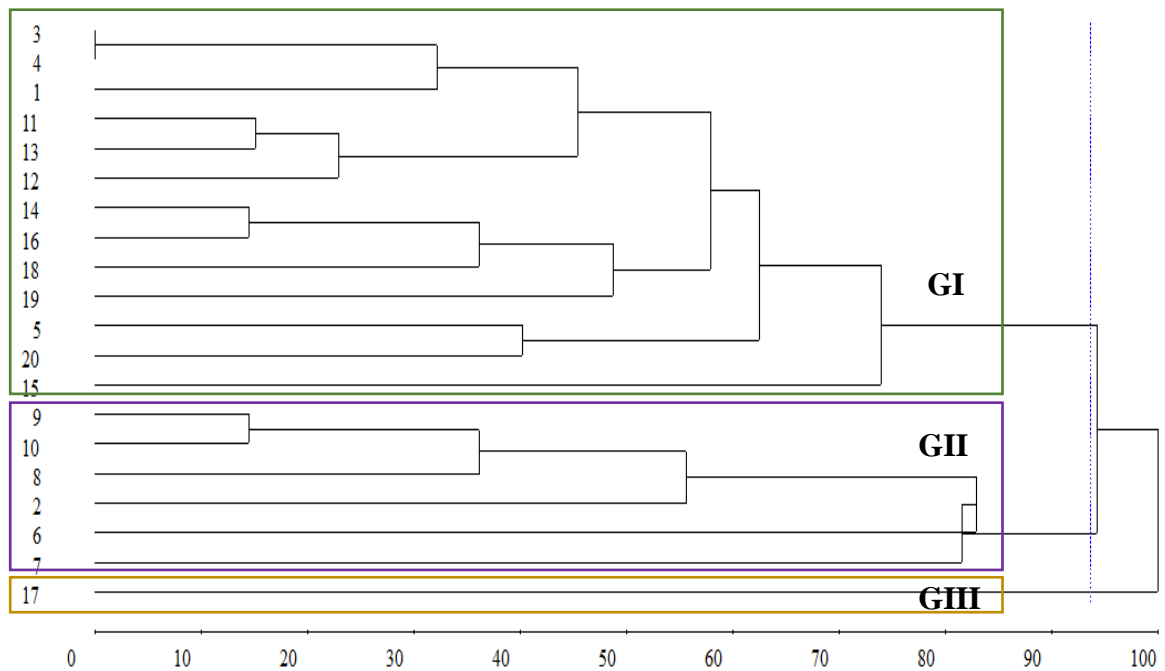
Ta = temperatura de anelamento. Y= C ou T; R = A ou G. TB= total de bandas; BP= bandas polimórficas e P% = Porcentagem de polimorfismo. Fonte: autora (2023).

A partir do marcador RAPD foi construído um dendrograma utilizando o método

UPGMA, sendo formado três grupos principais (Figura 6). O primeiro grupo é composto pelos indivíduos 3, 4, 1, 11, 13, 12, 14, 16, 18, 19, 5, 20, e 15. O segundo grupo, é formado pelos indivíduos 9, 10, 8, 2, 6 e 7. O terceiro grupo, foi formado apenas pelo indivíduo 17.

Em relação a separação dos indivíduos/sementes de acordo com a árvore que foram coletadas, tem-se que no grupo I, os indivíduos da árvore A (1, 3, 4 e 5) e C (11, 12, 13, 14 e 15) e D (16, 18, 19 e 20), ficaram no mesmo grupo e bem próximos entre eles. No caso dos indivíduos 3 e 4 não há diferença molecular entre eles com os primers RAPD utilizados. Além disso, no grupo II, todos os indivíduos fazem parte da mesma árvore, com exceção do indivíduo 2. O indivíduo 17, se destaca por ter ficado isolado, indicando maior variabilidade em relação aos demais, de acordo com esse marcador.

Figura 6 – Dendrograma de dissimilaridade genética (UPGMA) em 20 indivíduos do acesso BGC 676, obtido por meio do complemento aritmético do coeficiente de Jaccard, estimado com base em 10 marcadores RAPD.



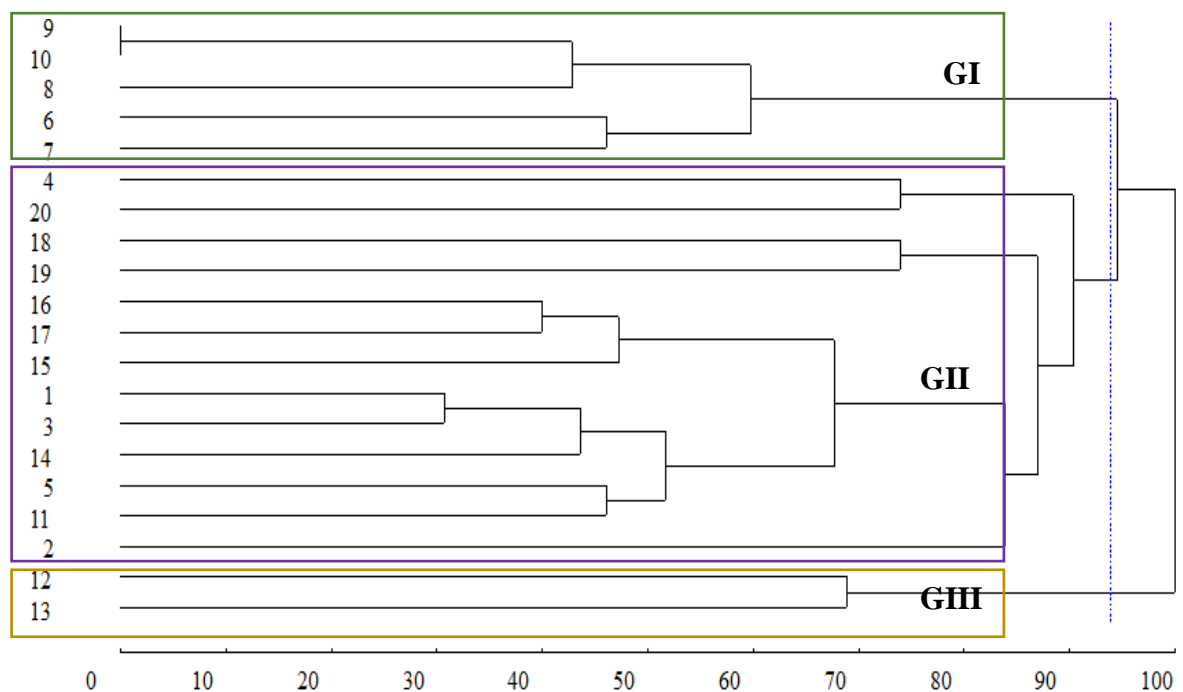
A linha vertical azul indica o ponto de corte a 94%, seguindo o critério de Mojena (1977). Os indivíduos correspondem à identificação das sementes utilizadas do acesso BGC 676. Árvore A: 1-5; Árvore B: 6-10; Árvore 3: 11-15; Árvore 4: 16-20. Fonte: autora (2023).

A partir do marcador ISSR foi construído um dendrograma utilizando o método UPGMA, sendo formado três grupos principais (Figura 7). O primeiro grupo é composto pelos indivíduos 9, 10, 8, 6 e 7. O segundo grupo é formado pelos indivíduos 4, 20, 18, 19, 16, 17, 15, 1, 3, 14, 5, 11 e 2. O terceiro grupo, é formado apenas pelos indivíduos 12 e 13.

Em relação a separação dos indivíduos/sementes de acordo com a árvore que

foram coletadas, tem-se que no grupo I, todos os indivíduos pertencem a mesma árvore, sendo que os indivíduos 9 e 10, não apresentaram diferença molecular entre eles com os primers ISSR utilizados. Além disso, os indivíduos da árvore A (1, 3, 4 e 5), C (11, 14 e 15) e D (16, 17, 18, 19 e 20), ficaram no mesmo grupo e bem próximos entre eles. Os indivíduos 12 e 13, ficaram agrupados em um único grupo, podendo indicar de acordo com esse marcador, maior semelhança entre eles e maior variabilidade quando comparado com os outros indivíduos, inclusive os da mesma árvore.

Figura 7 – Dendrograma de dissimilaridade genética (UPGMA) em 20 indivíduos do acesso BGC 676, obtido por meio do complemento aritmético do coeficiente de Jaccard, estimado com base em 10 marcadores ISSR.



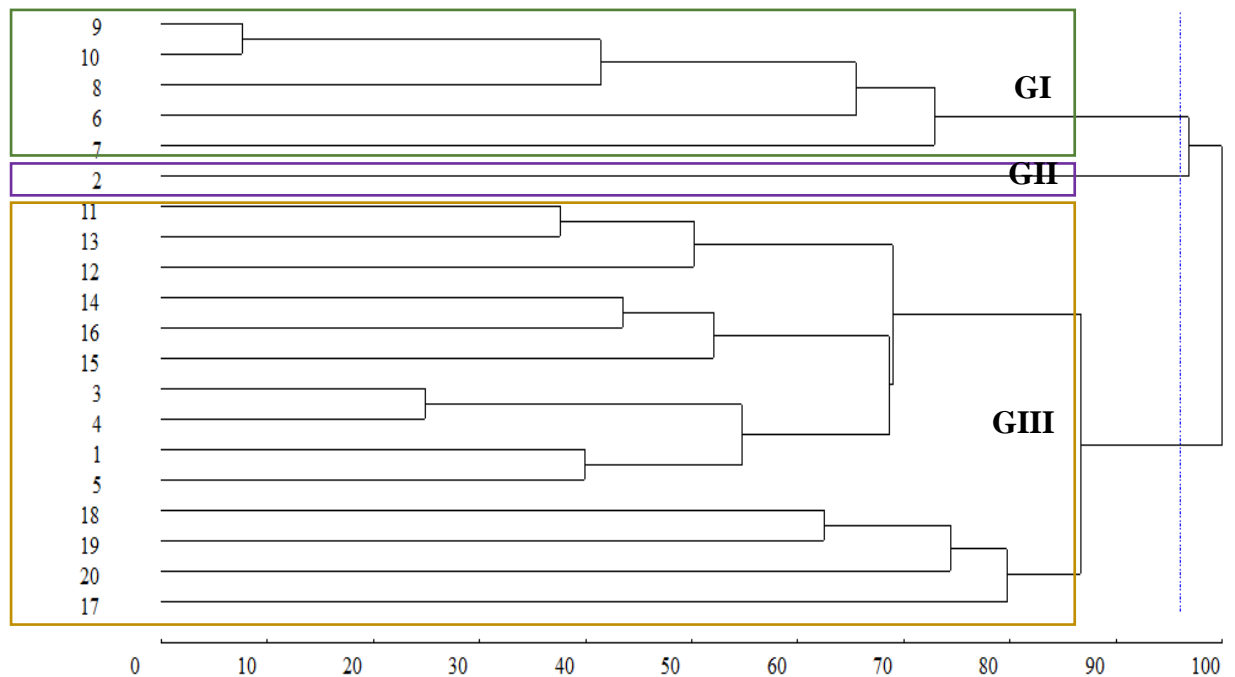
A linha vertical azul indica o ponto de corte a 94%, seguindo o critério de Mojena (1977). Os indivíduos correspondem à identificação das sementes utilizadas do acesso BGC 676. Árvore A: 1-5; Árvore B: 6-10; Árvore 3: 11-15; Árvore 4: 16-20. Fonte: autora (2023).

Unindo os resultados dos marcadores RAPD e ISSR foi construído um terceiro dendrograma utilizando o método UPGMA, sendo formado três grupos principais (Figura 8). O primeiro grupo, é formado pelos 9, 10, 8, 6 e 7. O segundo grupo, foi formado apenas pelo indivíduo 2. O terceiro grupo, é formado pelos indivíduos 11, 13, 12, 14, 16, 15, 3, 4, 1, 5, 18, 19, 20 e 17.

Em relação a separação dos indivíduos/sementes de acordo com a árvore que foram coletadas, tem-se que no grupo I, em que novamente todos os indivíduos da árvore B

(6, 7, 8, 9 e 10), ficaram agrupados. Além disso, no grupo III, os indivíduos da árvore A (1, 3, 4 e 5), C (11, 12, 13, 14 e 15) e D (17, 18, 19 e 20), ficaram próximos entre eles. O indivíduo 2, se destaca por ter ficado isolado, indicando maior variabilidade, a partir da junção dos dados dos marcadores RAPD e ISSR.

Figura 8 – Dendrograma de dissimilaridade genética (UPGMA) em 20 indivíduos do acesso BGC 676, obtido por meio do complemento aritmético do coeficiente de Jaccard, estimado com base em 10 marcadores RAPD e 10 marcadores ISSR.



A linha vertical azul indica o ponto de corte a 94%, seguindo o critério de Mojena (1977). Os indivíduos correspondem à identificação das sementes utilizadas do acesso BGC 676. Árvore A: 1-5; Árvore B: 6-10; Árvore 3: 11-15; Árvore 4: 16-20. Fonte: autora (2023).

De modo geral, os marcadores mostraram-se eficazes na separação das sementes, indicando que há similaridade genética entre os meios irmãos, pois nota-se o agrupamento e a proximidade de indivíduos da mesma árvore dentro dos grupos. Assim, os marcadores foram eficazes em mostrar essa informação, principalmente quando usando ambos os marcares, RAPD e ISSR.

Com relação a validação dos dendrogramas por meio do coeficiente de correlação cofenética (CCC), tem-se os valores de 0,76, 0,68 e 0,77, para os marcadores RAPD, ISSR e RAPD+ISSR, respectivamente. Para todos os CCC dos dendrogramas, os valores foram significativos ($P < 0,01$), pelo teste t. Valores de CCC entre 0,60 e 0,80, podem ser devido ao pequeno número de variáveis utilizadas (CONCEIÇÃO et al., 2014). Patto et al. (2004), obteve coeficiente cofenético de 0,61 e 0,62 e significativo, sendo considerado bons valores

para os ajuste nas análises de agrupamento. A partir disso, os resultados dos coeficientes cofenéticos dos dendrogramas formados com os marcadores, são valores aceitáveis, tendo em vista que foram significativos.

A partir da formação de grupos pelo método de Tocher (Tabela 6), foi possível visualizar a coerência com os agrupamentos concebidos pelos dendrogramas estabelecidos pelo método de UPGMA, embora não seja possível ver os que são mais próximos, apesar de estarem em grupos diferentes como no dendrograma.

Tabela 6 – Formação de grupos de indivíduos estabelecidos pelo método de Tocher de acordo com o marcador molecular do acesso BGC 676.

RAPD		ISSR		RAPD e ISSR	
Grupos	Indivíduos	Grupos	Indivíduos	Grupos	Indivíduos
I	3, 4, 16, 14, 18, 20, 19, 12, 13, 11, 1, 5	I	9, 10, 8, 6, 17, 7	I	9, 10, 8, 6
II	9, 10, 8, 2	II	1, 3, 14, 11, 5, 15, 16	II	3, 4, 1, 11, 5, 14, 16, 15, 12, 13
III	7	III	12, 13	III	18, 19
IV	6	IV	4	IV	20
V	17	V	19	V	17
VI	15	VI	18	VI	7
		VII	2	VII	2
		VIII	20		

Os indivíduos correspondem à identificação das sementes utilizadas do acesso BGC 676. Árvore A: 1-5; Árvore B: 6-10; Árvore 3: 11-15; Árvore 4: 16-20. Fonte: autora (2023).

A análise de agrupamento por meio do método de otimização de Tocher, separou os indivíduos em seis, oito e sete grupo, para os marcadores RAPD, ISSR e RAPD+ISSR (Tabela 6). De acordo com o método de Tocher, para o marcador RAPD, os indivíduos 7, 6, 17 e 15 são os que apresentam maior divergência. Para o marcador ISSR, os indivíduos 4, 19, 18, 2 e 20 são os que apresentam maior divergência. Para os marcadores RAPD+ISSR, os indivíduos 20, 17, 7 e 2 são os que apresentam maior divergência.

Os indivíduos 12 e 13 ficaram agrupados em ambos os métodos de agrupamento, pelo marcador ISSR. Para todos os marcadores, ocorreu a formação de um grande grupo pelo método de UPGMA, contendo a maioria dos indivíduos, mas no método de Tocher, esses mesmos indivíduos acabaram sendo distribuídos em grupos diferentes ou ficando isolados.

Os resultados obtidos pelos métodos UPGMA e Tocher, são similares, entretanto o Tocher apresentou a formação de mais grupos, indicando maior capacidade de separação.

Entretanto, o método UPGMA permite que sejam visualizados mais detalhes, por meio das distâncias dos indivíduos e inferir aqueles que são mais semelhantes dentro do grupo. Assim, os resultados da análise molecular, por meio dos métodos de UPGMA e de Tocher, baseados nos marcadores moleculares RAPD e ISSR, indicam uma alta variabilidade genética entre as sementes dentro do acesso BGC 676.

Percebe-se que há diferença quando se comparam os dados biométricos e moleculares do acesso BGC 676. No caso dos dados biométricos, os indivíduos foram representados pelas diferentes árvores que cada acesso possui. Assim, pelo método de agrupamento de UPGMA dos dados biométricos, temos que as árvores do acesso BGC 676 ficaram agrupadas, com exceção da árvore 2, identificada na análise pelo número 21 (Figura 5). Pelo método de agrupamento de Tocher dos dados biométricos (Tabela 4), as árvores ficaram separadas entre os grupos I, II e III. Nos dados moleculares, para cada árvore do acesso BGC 676, foram selecionadas aleatoriamente cinco sementes, sendo identificadas em ordem numérica. Assim, para cada marcador, foram formados diferentes grupos nos dois métodos de agrupamento avaliados (UPGMA e Tocher). Embora biometricamente as sementes sejam semelhantes, pelo método de UPGMA, molecularmente ocorreram diferenças. Embora haja indivíduos das mesmas árvores que são mais semelhantes molecularmente, como discutido anteriormente.

4 CONCLUSÃO

Os resultados biométricos e moleculares indicam variabilidade genética entre e dentro dos acessos. Apesar de apresentar acessos similares, os métodos foram eficazes em identificar os indivíduos (acessos e sementes) que diferem dos demais avaliados. Além disso, os métodos de agrupamento UPGMA e Tocher, para os dados biométricos e moleculares, foram parcialmente concordantes, em que os indivíduos que apresentaram similaridade foram ordenados no mesmo grupo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. H. F. et al. Viabilidade econômica da produção de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Nativa**, v. 5, n. 1, p. 09-15, 2017.
- BRAINER, M. S. C. P.; VIDAL, M. F. **Cajucultura Nordestina em recuperação**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, ano 3, n. 54, nov. 2021.
- CARNEIRO, L.A et al. Morphological characterization and genetic divergence of a cashew population in Floriano, Piauí, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 18, n. 3, p. 1-8, 2019.
- CONCEIÇÃO, A. L. S. et al. Variabilidade genética e importância relativa de caracteres em Acessos de tabaco (*Nicotiana Tabacum* L.) tipo broad leaf por meio de marcadores fenotípicos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 19, p. 1-8, 2014.
- CORREA, A. S. A. S. et al. Biometria de frutos e sementes e divergência genética entre matrizes de *Parkia pendula* (will.) Benth. Ex walp.(Anelím saia) nativa na Amazônia Matogrossense. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. 1-14, 2021.
- CRUZ, E.D.; CARVALHO, J.E.U. Biometria de frutos e sementes e germinação de curupixá (*Micropholis cf. venulosa*. Mart. & Eichler – Sapotaceae). **Acta Amazônica**, v.33, n.3, p.389–398, 2003.
- CRUZ, C.D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Sci Agron**, v. 38, n. 4, p. 547-552, 2016.
- DANTAS, A. C. A. et al. Caracterização morfológica de cajuí (*Anacardium* sp.) do Cerrado Sul Maranhense. **Acta Tecnológica**, v. 14, n. 1, p. 79-91, 2019.
- DAO, T. P. et al. Study of jelly drying cashew apples (*Anacardium occidentale* L.) processing. **Food Science & Nutrition**, v. 10, n. 2, p. 363-373, 2022.
- FALEIRO, F. G. et al. O Gênero *Passiflora*: diversidade, conservação e uso. In: **Banco de germoplasma de *Passiflora* L. 'Flor da Paixão': caracterização fenotípica, diversidade genética, fotodocumentação e herborização**. FALEIRO, F. G. et al. (Eds.). Brasília, DF: Pro Impress, 2020. 140 p.
- GRIGOLO, S. et al., Implicações da análise univariada e multivariada na dissimilaridade de acessos de feijão comum. **Rev. Ciênc. Agrov.**, v. 17, n. 3, p. 351-260, 2018.
- GOOGLE EARTH. Disponível em: <<http://earth.google.com/>>. Acesso em: 18 de junho de 2023.
- GUSMÃO, E.; VIEIRA, F. A.; JÚNIOR, E. M. F. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.). **Cerne**, v. 12, n. 1, p. 84-91, 2006.
- IBGE. **Produção de Castanha-de-caju (cultivo)**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/castanha-de-caju-cultivo/br>>.

Acesso em: 09 de abril de 2023.

JEYAVISHNU, K. et al. Increased revenue with high value-added products from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) addressing global challenges. **Food and Bioprocess Technology**, v. 14, p. 985-1012, 2021.

MOJENA, R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. *The Computer Journal*, v. 20, p. 359-363, 1977.

OGUNSINA, B. S. Crackability and Chemical composition of pre-treated cashew nuts using a hand-operated knife cutter. **Agric Eng Int: CIGR Journal**, v. 15, n. 2, p. 275-283, 2013.

OLIVEIRA, J. S. et al. Recursos Genéticos e Caracterização Morfo-Agronômica. In: **Banco de germoplasma de Passiflora L. 'Flor da Paixão': caracterização fenotípica, diversidade genética, fotodocumentação e herborização**. FALEIRO, F. G. et al. (Eds.). Brasília, DF: Pro Impress, 2020. 140 p.

PAIVA, J. R.; CRISÓSTOMO J. R.; BARROS, L. M. **Recursos genéticos do cajueiro: coleta, conservação, caracterização e utilização**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003. 43 p.

PAIVA, S. R. et al. Caracterização de Recursos Genéticos. In: PAIVA, S.R.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; SALOMÃO, A. N.; JOSÉ, S. C. B. R.; MOREIRA, J. R. A. (eds.). **Recursos genéticos: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019. 298 p.

PATTO, M. C. V. et al. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, n. 137, p. 63–72, 2004.

SINGH, P., et al. Genetic diversity of sugarcane hybrid cultivars by RAPD markers. **3 Biotech**, v. 7, n. 3, p. 222, 2017.

SOUZA, R. L. et al. Genetic variability revealed by microsatellite markers in a germplasm collection of *Jatropha curcas* L. in Brazil: an important plant for biofuels. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 19, p. 337-346, 2019.

WADE, R. et al. Macroalgal germplasm banking for conservation, food security, and industry. **PLoS biology**, v. 18, n. 2, p. 1-10, 2020.