

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Agrárias
Mestrado Acadêmico em Ciências Florestais

Pedro Vitor de Souza Silva

Diversidade genética em copaibeiras e pequizeiros por meio de oligonucleotídeos ISSR

Montes Claros

2024

Pedro Vitor de Souza Silva

Diversidade genética em copaibeiras e pequizeiros por meio de oligonucleotídeos ISSR

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Ciências Florestais da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Florestais.

Orientador: Prof. Dr. Demerson Arruda Sanglard.

Coorientadora: Profa. Dra. Talita Baldin.

Coorientador: MSc. Teddy Marques Farias.

Montes Claros

Fevereiro 2024

Silva, Pedro Vitor de Souza.

S586d
2024 Diversidade genética em copaibeiras e pequizeiros por meio de oligonucleotídeos
ISSR [manuscrito] / Pedro Vitor de Souza Silva. Montes Claros, 2024.
67 f.: il.

Dissertação (mestrado) - Área de concentração em Ciências Florestais.
Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador: Demerson Arruda Sanglard

Banca examinadora: Demerson Arruda Sanglard, Leandro Silva de Oliveira,
Ariadna Faria Vieira..

Inclui referências: f. 27-37; 51-56

1. Biodiversidade -- Teses. 2. Biodiversidade -- Conservação -- Teses. 3. Genética
Molecular -- Teses. I. Sanglard, Demerson Arruda. II. Universidade Federal de Minas
Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 630

ELABORADA PELA BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA DO ICA/UFMG
Nádia Cristina Oliveira Pires / CRB-6/2781



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 06 dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte e quatro, às 14:00 horas, sob a Presidência do Professor Demerson Arruda Sanglard, D. Sc. (Orientador – UFMG/ICA) e com a participação dos Professores Leandro Silva de Oliveira, D. Sc. (UFMG/ICA) e Ariadna Faria Vieira, D. Sc. (UESPI), reuniu-se, por videoconferência, a Banca de Defesa de Dissertação de **Pedro Vitor de Souza Silva**, aluno do Curso de Mestrado em Ciências Florestais. Após a avaliação do referido aluno, a Banca Examinadora procedeu à publicação do resultado da defesa da Dissertação intitulada: “**DIVERSIDADE GENÉTICA EM COPAIBEIRAS E PEQUIZEIROS POR MEIO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS ISSR**”, sendo o aluno considerado **APROVADO**. E, para constar, eu, Professor Demerson Arruda Sanglard, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

OBS.: O aluno somente receberá o título após cumprir as exigências do ARTIGO 74 do regulamento do Curso de Mestrado em Ciências Florestais, conforme apresentado a seguir:

Art. 74 – Para dar andamento ao processo de efetivação do grau obtido, o candidato deverá, após a aprovação de sua Dissertação e da realização das modificações propostas pela banca examinadora, se houver, encaminhar à secretaria do colegiado do Curso, com a anuência do orientador, no mínimo 3 (três) exemplares impressos e 1 (um) exemplar eletrônico da dissertação, no prazo de 60 (sessenta) dias.

Montes Claros - MG, 06 de Fevereiro de 2024

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Ariadna Faria Vieira, Usuária Externa**, em 20/02/2024, às 11:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leandro Silva de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 20/02/2024, às 13:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Demerson Arruda Sanglard, Professor do Magistério Superior**, em 20/02/2024, às 13:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3041624** e o código CRC **86193D07**.

Aos meus pais Márcia e José por sempre
acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Minas Gerais – Instituto de Ciências Agrárias pela concessão da oportunidade de participar do programa de mestrado, o que permitiu o aprimoramento substancial dos meus conhecimentos acadêmicos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro a pesquisa.

Ao meu orientador, professor Demerson Arruda Sanglard, cuja orientação sábia e apoio constante foram fundamentais para o sucesso desta jornada acadêmica. Sua inspiração e orientação foram inestimáveis.

Ao Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciências Agrárias pelo valioso amparo ao longo do meu mestrado. A colaboração e recursos fornecidos foram essenciais para o sucesso da minha pesquisa.

À Ana Carolina Ataíde Silveira pelos ensinamentos e apoio técnico durante a realização da minha pesquisa.

À Flávia Échila Ribeiro Batista, pelo encorajamento e apoio técnico durante a realização da minha pesquisa.

Ao professor Leandro Silva de Oliveira pelo apoio e por ter aceito o convite para compor a banca de defesa.

À professora Ariadna Faria Vieira por ter aceito o convite para compor a banca de defesa.

Aos meus pais Márcia e José e irmãs Camila e Amanda pelo apoio incondicional durante todo o meu mestrado. Sua constante dedicação e encorajamento foram fundamentais para minha conquista.

Ao Fernando, Rodrigo e Gabriel, pessoas especiais que antes de tudo acreditavam em meu potencial, apoiando em todo o percurso.

Aos meus amigos de mestrado, Matheus Antunes, Maria Fernanda Fonseca, Maria Fernanda Lacerda e Adriane Santos que foram fonte inesgotável de apoio durante todo o processo.

A Deus por me capacitar e guiar ao longo do caminho, concedendo sabedoria e força para alcançar este marco em minha jornada acadêmica.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal e profissional.

“The fittest is not the one who survives, nor the most intelligent, but the one most responsive to change” (Charles Darwin)

RESUMO

A copaibeira (*Copaifera langsdorffii* Desf.) e o pequiizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) são espécies arbóreas de destaque na flora brasileira, desempenhando funções relevantes em ecossistemas tropicais. A copaibeira se destaca pela exsudação de um óleo resinífero com propriedades medicinais e industriais. O pequiizeiro possui seus frutos apreciados na culinária regional, além de potencialidades farmacêuticas. Estudos de diversidade genética são subsídios para a elaboração de estratégias de conservação, manejo sustentável e compreensão de dinâmicas populacionais. O presente estudo teve como objetivo estimar a diversidade genética entre acessos de copaibeira e pequiizeiro em municípios situados na mesorregião Norte e Noroeste do estado de Minas Gerais, Brasil por meio de oligonucleotídeos ISSR (Inter Simple Sequences Repeats). Os acessos de Copaíba foram obtidos em Montes Claros-MG e Mirabela-MG, totalizando 20 acessos. Por sua vez, os acessos de pequiizeiro foram coletados em Bocaiuva-MG, Bonfinópolis-MG, Dom Bosco-MG e Salinas-MG, totalizando 40 acessos. Utilizou-se um protocolo adaptado do método CTAB para extração de DNA, seguido de reações de PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando oligonucleotídeos ISSR provenientes da coleção da University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canadá), com testagem prévia de gradientes de temperatura. Para a copaibeira foram testados 16 oligonucleotídeos, dos quais 11 evidenciaram polimorfismos. No caso do pequiizeiro, todos os 100 oligonucleotídeos da coleção foram testados, sendo que apenas quatro manifestaram polimorfismos, inviabilizando a construção de matrizes binárias viáveis para a estimativa das dissimilaridades. Para a copaibeira, os dados moleculares foram utilizados na estimativa das distâncias genéticas entre acessos, calculadas pelo índice de 'Nei e Li'. Essas informações foram aplicadas nas análises de agrupamento 'Hierárquico' e otimização de 'Tocher'. As reações produziram 105 fragmentos utilizados na geração da matriz de dissimilaridade, revelando uma ampla variabilidade entre os 20 acessos de copaibeira (de 19,04% a 75,38%). A estimativa do poder discriminatório do loco em H_{Oligo} foi de 0,2837, enquanto o do PIC_{Oligo} foi de 0,2279. Um total de 97 pares de acessos apresentaram valores superiores a 50% de dissimilaridade. O Coeficiente de Correlação Cofenética (CCC) foi elevado, atingindo 0,8275 nos procedimentos de obtenção do dendrograma (estresse de 11,92%). As aplicações dos métodos de agrupamentos 'Hierárquico' e 'Otimização de Tocher' resultaram na separação em três grupos, distinguindo os acessos 1, 14 e reunião dos demais. Os resultados dos testes dos pequiizeiros sugerem a necessidade da utilização de outros marcadores para construção da dissimilaridade. Quanto aos resultados da copaibeira, apresentam potencial para subsidiar a elaboração de estratégias de conservação.

Palavras-chave: Dissimilaridade Genética. Estratégias de Conservação. Marcadores Moleculares.

ABSTRACT

The copaiba tree (*Copaifera langsdorffii* Desf.) and the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb.) are prominent tree species in the Brazilian flora, playing relevant roles in tropical ecosystems. The copaiba tree stands out for exuding a resinous oil with medicinal and industrial properties. The pequi tree has its fruits appreciated in regional cuisine, besides pharmaceutical potentialities. Studies of genetic diversity provide support for the development of conservation strategies, sustainable management, and understanding of population dynamics. This study aimed to estimate the genetic diversity among accessions of copaiba and pequi trees in municipalities located in the North and Northwest mesoregions of the state of Minas Gerais, Brazil, using ISSR (Inter Simple Sequences Repeats) oligonucleotides. The Copaiba accessions were obtained in Montes Claros-MG and Mirabela-MG, totaling 20 accessions. In turn, the pequi accessions were collected in Bocaiuva-MG, Bonfinópolis-MG, Dom Bosco-MG, and Salinas-MG, totaling 40 accessions. A protocol adapted from the CTAB method for DNA extraction was used, followed by Polymerase Chain Reaction (PCR) reactions using ISSR oligonucleotides from the University of British Columbia collection (UBC primer set #9, Vancouver, Canada), with prior testing of temperature gradients. For the copaiba tree, 16 oligonucleotides were tested, of which 11 showed polymorphisms. In the case of the pequi tree, all 100 oligonucleotides from the collection were tested, and only four manifested polymorphisms, making it impossible to construct viable binary matrices for dissimilarity estimation. For the copaiba tree, molecular data were used to estimate genetic distances among accessions, calculated by the 'Nei and Li' index. These pieces of information were applied in hierarchical clustering and Tocher optimization analyses. The reactions produced 105 fragments used in the generation of the dissimilarity matrix, revealing wide variability among the 20 copaiba accessions (from 19.04% to 75.38%). The estimated discriminatory power of the locus in HOLigo was 0.2837, while that of PICOLigo was 0.2279. A total of 97 pairs of accessions showed dissimilarity values exceeding 50%. The Cophenetic Correlation Coefficient (CCC) was high, reaching 0.8275 in dendrogram acquisition procedures (stress of 11.92%). The applications of hierarchical clustering and Tocher optimization methods resulted in the separation into three groups, distinguishing accessions 1, 14, and the rest. The results of the pequi tree tests suggest the need for the utilization of other markers for dissimilarity construction. As for the copaiba tree results, they present potential to support the development of conservation strategies.

Keywords: Genetic Dissimilarity. Conservation Strategies. Molecular Markers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Amplificação dos genomas de 20 acessos (folhas) de copaibeira. As sequências ordinais superior e inferior referem-se aos oligonucleotídeos ISSR 812, ISSR 886, ISSR 890 (Ta: 54°C) e ISSR 810 (Ta: 56°C), respectivamente. Cada uma das amostras continha 25 uL de mix-PCR, 5 uL de GelRed™ e 3 uL de corante tipo IV, submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v), durante 3 h.48
- Figura 2.** Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, com base na matriz de dissimilaridade do índice de ‘Nei e Li’, gerada por dados binários de fragmentos ISSR amplificados em 20 acessos de Copaibeira.50
- Figura 3.** Padrões eletroforéticos em testes de gradientes de temperaturas para acessos de copaibeiras (Oligonucleotídeos ISSR 856, 888, 889 e 812). As letras A e B referem-se a dois genótipos escolhidos aleatoriamente da população. As linhas vermelhas indicam as temperaturas de anelamento, e as azuis os oligonucleotídeos escolhidos.....58
- Figura 4.** Padrões eletroforéticos em testes de gradientes de temperaturas para acessos de copaibeiras (Oligonucleotídeos ISSR 816, 828, 810 e 847). As letras A e B referem-se a dois genótipos escolhidos aleatoriamente da população. As linhas vermelhas indicam as temperaturas de anelamento, e as azuis os oligonucleotídeos escolhidos.....59
- Figura 5.** Padrões eletroforéticos em testes de gradientes de temperaturas para acessos de copaibeiras (Oligonucleotídeos ISSR 890, 876, 886 e 842). As letras A e B referem-se a dois genótipos escolhidos aleatoriamente da população. As linhas vermelhas indicam as temperaturas de anelamento, e as azuis os oligonucleotídeos escolhidos.....60
- Figura 6.** Padrões eletroforéticos em testes de gradientes de temperaturas para acessos de copaibeiras (Oligonucleotídeos ISSR 818, 827, 855 e 884). As letras A e B referem-se a dois genótipos escolhidos aleatoriamente da população. As linhas vermelhas indicam as temperaturas de anelamento, e as azuis os oligonucleotídeos escolhidos.....61
- Figura 7.** Padrões eletroforéticos a partir das amplificações via PCR dos genomas de 20 acessos das Copaibeiras (Oligonucleotídeo ISSR 818) Ta: 61°C; (Oligonucleotídeo ISSR 842) Ta: 51°C.62
- Figura 8.** Padrões eletroforéticos a partir das amplificações via PCR dos genomas de 20 acessos das Copaibeiras (Oligonucleotídeos ISSR 812, 886 e 890) Ta: 54°C; (Oligonucleotídeo ISSR 810) Ta: 56°C.....63
- Figura 9.** Padrões eletroforéticos a partir das amplificações via PCR dos genomas de 20 acessos das Copaibeiras (Oligonucleotídeos ISSR 816 e 856) Ta: 59°C; (Oligonucleotídeo ISSR 888) Ta: 63°C; (Oligonucleotídeo ISSR 847) Ta: 45°C.64

Figura 10. Padrões eletroforéticos em testes de gradientes de temperaturas para acessos de pequizeiros (Oligonucleotídeos ISSR 828, 833, 839 e 845). As letras A e B referem-se a dois genótipos escolhidos aleatoriamente da população. As linhas vermelhas indicam as temperaturas de anelamento, e as azuis os oligonucleotídeos escolhidos.....65

Figura 11. Padrões eletroforéticos em testes de gradientes de temperaturas para acessos de pequizeiros (Oligonucleotídeos ISSR 806 e 831). As letras A e B referem-se a dois genótipos escolhidos aleatoriamente da população. As linhas vermelhas indicam as temperaturas de anelamento, e as azuis os oligonucleotídeos escolhidos.66

Figura 12. Recortes dos passos envolvendo a execução do trabalho - Laboratório de Biotecnologia, Centro de Pesquisas em Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, MG, Brasil.67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados da quantificação por espectrofotometria de DNA's de folhas de copaibeira.	43
Tabela 2. Resultados da quantificação por espectrofotometria de DNA's de folhas de pequiheiro.	44
Tabela 3. Resultados dos testes de gradiente de temperaturas de anelamento, envolvendo DNA's de folhas da Copaibeira amplificados com oligonucleotídeos ISSR desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada).	45
Tabela 4. Resultados dos testes de gradiente de temperaturas de anelamento, envolvendo DNA's de folhas do Pequiheiro amplificados com oligonucleotídeos ISSR desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada).	45
Tabela 5. Resultados dos testes de gradiente de temperaturas de anelamento, envolvendo DNA's de folhas de Copaibeira amplificados com oligonucleotídeos ISSR desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada).	48
Tabela 6. Matriz de dissimilaridade (%) (complemento aritmético do índice de 'Nei e Li' entre 20 acessos de copaibeira, estimadas a partir de 105 fragmentos (locos), a partir de 11 oligonucleotídeos ISSR desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada), representadas em cinza as variações mais divergentes entre si (menos similares).	49
Tabela 7. Agrupamento de 20 acessos da Copaibeira pelo método de Otimização de Tocher (matriz obtida do índice de 'Nei e Li'), com base em 105 fragmentos amplificados por oligonucleotídeos ISSR - University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada).....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCC	-	Coeficiente de Correlação Cofenética
CTAB	-	Cetyltrimethylammonium Bromide
DNA	-	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	-	Phosphated eoxyribonucleotides
EDTA	-	Ethylenediaminetetraacetic Acid
GENES	-	Aplicativo computacional em Genética e Estatística Experimental
H _{Oligo}	-	Heterozygosity of Oligonucleotides
ISSR	-	Inter Simple Sequences Repeats
MgCl ₂	-	Magnesium dichloride
NaCl	-	Sodium chloride
PCR	-	Polymerase Chain Reaction
PIC _{Oligo}	-	Polymorphism Information Content of Oligonucleotides
PVP	-	Polivinilpirrolidona
SSR	-	Simple Sequence Repeats
Tris-HCL	-	Tris hydrochloride
UBC	-	University of British Columbia, Canada
UPGMA	-	Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 O Cerrado brasileiro	18
3.2 Espécies do cerrado: Copaibeira e Pequizeiro	18
3.2.1 Copaibeira	18
3.2.2 Pequizeiro.....	20
3.3 Diversidade genética em espécies florestais.....	23
3.4 Oligonucleotídeos ISSR aplicados a estudos de diversidade	25
4. REFERÊNCIAS	27
5. ARTIGO	38
5.1 Artigo – Diversidade genética em copaibeiras e pequizeiros por meio de oligonucleotídeos ISSR.	38
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
ANEXOS	58

1. INTRODUÇÃO

A copaibeira (*Copaifera langsdorffii* Desf.), conhecida popularmente como copaíba, configura-se como uma relevante espécie arbórea da família Fabaceae. Apresenta um padrão de crescimento lento, raramente ultrapassando a marca de 2 metros de altura nos primeiros dois anos de desenvolvimento (Lorenzi, 2008). Entretanto, demonstra a capacidade de atingir alturas entre 25 a 35 metros, tendo ampla distribuição no Brasil, principalmente no Cerrado e Amazônia (Silva; Filho, 2021). O principal produto de interesse derivado da copaíba é o óleo, cujas propriedades fitoquímicas conferem-lhe uma ampla aplicação, notadamente nas áreas de nutrição humana, cosméticos e fármacos; destinados tanto ao uso humano quanto veterinário (Trindade; Silva; Setzer, 2018).

O pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) é uma espécie arbórea semidecídua, heliófita e seletiva xerófila, crescendo normalmente como uma árvore frondosa, com variações em resposta ao ambiente e a grande distribuição por todo o bioma Cerrado (Lisboa *et al.*, 2020). Os frutos possuem elevada importância em aspectos socioeconômicos, com destaque para culinárias regionais, extração de óleo e xaropes medicinais (Ataíde *et al.*, 2019). Além disso, a comercialização do pequi é uma importante fonte de renda para agricultores e extrativistas, contribuindo para a economia regional. Logo, inúmeras famílias se beneficiam na época de safra do pequi, tendo a cultura como fonte de renda e de emprego (Silva, 2009; Martins *et al.*, 2021).

As atividades extrativistas configuram-se como uma alternativa econômica ao desmatamento e à monocultura, baseando-se em práticas que visam a colheita de produtos sem comprometer a integridade dos ecossistemas. Essa abordagem enfatiza a obtenção de recursos de forma equilibrada, respeitando os limites de regeneração da biodiversidade local (Silva, 2011; Oliveira *et al.*, 2017). A comercialização pode ocorrer de forma direta, em feiras e mercados locais, ou indireta, por meio de intermediários e cooperativas especializadas em produtos regionais. Além disso, incentiva a preservação do cerrado ao viabilizar práticas que valorizam a conservação, garantindo a preservação a longo prazo dos recursos, mediante a promoção da manutenção da biodiversidade e a minimização dos impactos ambientais (Silva e Souza, 2022; Ferreira; Bartachevits, 2022).

No que tange à copaibeira, esta tem sido objeto de extensivas investigações por vários grupos de pesquisa, dada a relevância de suas características. Por outro lado, o elevado valor comercial associado à mesma tem resultado em uma contínua exploração (Martini *et al.*, 1998; Frazão *et al.*, 2023). A madeira desta espécie possui propriedades de notável resistência à umidade e ataques de insetos xilófagos, tornando-se particularmente atrativa para o mercado (Pieri *et al.*, 2009).

A habilidade de gerir de maneira equilibrada a utilização dos recursos assume relevância

crucial para a preservação tanto da espécie em questão quanto dos ecossistemas nos quais ela está integrada (Oliveira *et al.* 2020). Nesse contexto, a copaibeira e o pequizeiro encontram-se suscetíveis a ameaças decorrentes de limitações técnicas de manejo, as quais dependem do entendimento dos efeitos da erosão genética, bem como dos mecanismos vegetativos e reprodutivos (Silva *et al.*, 2012). Dessa forma, uma abordagem equilibrada para instituir tal exploração deve estar fundamentada no entendimento da dispersão filogeográfica, destacando o estudo da diversidade genética. Tais conhecimentos revelam-se essenciais para subsidiar programas de conservação de recursos genéticos e práticas de manejo florestal (Vilela *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2020).

Nesse contexto, os padrões de variabilidade genética observados entre os acessos de copaibeira e pequizeiro possibilitam aprimorar a seleção, conservação e aplicação de técnicas de manejo condizentes com as particularidades dessas espécies de ocorrência natural, sendo efetuada através da análise sistemática de marcadores genéticos selecionados, coleta de dados genômicos, interpretação abrangente dos resultados e subsequente desenvolvimento de abordagens estratégicas congruentes com os objetivos predefinidos (Gomes *et al.*, 2022). Autores de estudos que norteiam a análise de diversidade genética de espécies vegetais e animais, muitas vezes optaram por oligonucleotídeos ISSR (Inter Simple Sequences Repeats) para suas pesquisas, pois são de baixo custo e reprodutíveis em diferentes laboratórios (Ng; Tan, 2015).

A utilização de oligonucleotídeos ISSR em estudos de diversidade genética é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes de conservação. A técnica possibilita a avaliação intrapopulacional da diversidade genética, permitindo identificar padrões, como a distribuição geográfica dessa variabilidade (Charlesworth, 2009). Essa análise contribui significativamente para a compreensão da estrutura populacional, facilitando a identificação de áreas com diferentes níveis de diversidade genética e, conseqüentemente, a priorização de locais para ações de conservação e restauração, aumentando as perspectivas de reintrodução bem-sucedida. Com base nessas informações, os gestores de conservação podem implementar estratégias de manejo adaptativo, abordando desafios como mudanças climáticas, pragas ou doenças, e realizar o monitoramento contínuo das populações ao longo do tempo, prevenindo potenciais efeitos de gargalo genético (Caballero *et al.*, 2010; Felix *et al.*, 2020; Morillo *et al.*, 2022; Pimenta *et al.*, 2022). Neste contexto, objetivou-se neste trabalho estimar a diversidade genética envolvendo acessos de copaibeiras e pequizeiros por meio de oligonucleotídeos ISSR.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estimar a diversidade genética envolvendo acessos de copaibeiras e pequizeiros por meio de oligonucleotídeos ISSR.

2.2 Objetivos Específicos

- Validar protocolos de extrações de DNA eficazes para folhas de copaibeira e pequizeiro;
- Realizar varreduras de amplicons (locos) em genomas de acessos de copaibeiras e pequizeiros, por meio de oligonucleotídeos ISSR;
- Estimar a diversidade genética por meio de padrões eletroforéticos (matrizes de dados binários) e procedimentos biométricos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O Cerrado brasileiro

O Cerrado brasileiro é a maior formação de savana neotropical da América do Sul, além de ser o segundo maior bioma do Brasil, se estendendo por cerca de 200 milhões de hectares. Abrange cerca de 24% do território brasileiro com grande diversidade de flora (Batlle-Bayer *et al.*, 2010; IBGE, 2019). Sendo assim, é um bioma com características específicas e grande diversidade, considerado uma das áreas de maior biodiversidade e endemismo do mundo (Klink; Machado, 2005; Schiassi *et al.*, 2018). A flora do Cerrado possui em torno de 12 mil espécies catalogadas e destas, estima-se que 4 mil sejam endêmicas (ISPN, 2021).

A copaibeira é uma espécie arbórea presente neste bioma, apresentando relevância econômica substancial devido aos seus recursos madeireiros e não madeireiros (Junior e Pinto, 2002). Uma revisão conduzida por Pieri *et al.* (2009) evidenciou o potencial tecnológico e as aplicações desta espécie, destacando-se o óleo, utilizado na medicina tradicional popular e silvícola por mais de 500 anos.

Este bioma possui uma grande variedade de espécies frutíferas, muitas delas exploradas economicamente por comunidades locais. As espécies frutíferas nativas desse bioma possuem aceitação no mercado consumidor, pois seus frutos contêm sabores marcantes e peculiares (Silva *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2017). Dentre as espécies, o pequizeiro abrange alta ocorrência neste bioma, sendo considerado uma vitrine típica para as populações externas a esta região. Seu fruto é amplamente utilizado na culinária regional e possui propriedades medicinais e nutricionais importantes (Oliveira *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2016).

A exploração dessas duas espécies pode constituir uma relevante alternativa econômica, contribuindo simultaneamente para a preservação da biodiversidade e para o avanço de uma silvicultura mais sustentável. Este resultado é alcançado mediante a implementação de práticas que buscam conciliar a utilização responsável dos recursos naturais com a efetiva conservação da diversidade biológica, destacando a importância de estratégias que garantam o desenvolvimento a longo prazo nas atividades exploratórias (Rodrigues *et al.*, 2021).

3.2 Espécies do cerrado: Copaibeira e Pequizeiro

3.2.1 Copaibeira

A *Copaifera langsdorffii* Desf., conhecida popularmente como copaíba, é uma árvore pertencente à família Fabaceae, amplamente distribuída nas regiões tropicais da América Latina. A copaíba atinge elevadas alturas, apresentando folhas compostas e inflorescências racemosas com flores esbranquiçadas (Braga *et al.*, 2022).

A copaibeira configura-se como uma árvore semidecídua, caracterizada por alcançar alturas entre 5 a 35 metros e diâmetros à altura do peito (DAP) oscilando entre 20 a 60 centímetros, embora, em estágio adulto e sob condições específicas na floresta pluvial, possa atingir notáveis 35 metros de altura e 100 centímetros de DAP (Carvalho, 2014; Braga *et al.*, 2022). Na Caatinga, a copaíba exibe dimensões mais reduzidas, com alturas variando entre 1,80 a 10 metros. Já nos campos rupestres da Serra da Bocaina, localizados em Minas Gerais, a espécie adota um porte arbustivo, atingindo aproximadamente 1,20 metros de altura (Carvalho, 2014; Kuhlmann, 2018). A copa, de largura considerável, ostenta uma folhagem pouco densa, cuja característica distintiva reside na tonalidade avermelhada que adquire no início da primavera, conferindo-lhe uma identidade visual inconfundível (Carvalho, 2014).

Esta espécie apresenta folhas compostas, alternas e paripinadas, compostas por até seis pares de folíolos, os quais possuem dimensões variáveis, situando-se entre 2 a 4,5 centímetros de comprimento e 1 a 2 centímetros de largura (Carvalho, 2014; Russo, 2022). Os folíolos estão sustentados por pecíolos de 1 a 1,5 centímetros de comprimento, caracterizados por sua natureza glandulosa. Destaca-se que as folhas recém-desenvolvidas exibem coloração rosa-clara, constituindo-se como um elemento distintivo valioso para fins de identificação taxonômica (Carvalho, 2014).

As flores da copaibeira são zigomorfas e apétalas, apresentando quatro sépalas livres. A corola destas flores varia de branco-amarelada a creme-rosada, com dimensões que oscilam entre 4 a 6 milímetros de comprimento ou 8 milímetros de diâmetro quando completamente desabrochadas (Carvalho, 2014; Crestana e Kageyama, 1989). Dotadas de perfume, as flores são efêmeras e dispostas em panículas terminais que abrangem quase a totalidade da copa da árvore, alcançando até 10 centímetros de comprimento e contendo de 5 a 35 flores por inflorescência (Carvalho, 2014).

O fruto da copaíba é um legume unispermo, deiscente e estipitado, assumindo uma forma obliquamente elipsóide. Inicialmente de coloração avermelhada quando jovem, o fruto transiciona para tons de marrom durante a maturação. Destaca-se pela elevada concentração de óleo em seu interior, apresentando dimensões que variam entre 4 a 5 centímetros de comprimento por 2 a 3 centímetros de largura (Crestana e Kageyama, 1989).

A copaibeira é uma planta hermafrodita, caracterizada por um sistema de reprodução predominantemente alógamo e misto (Pedroni *et al.*, 2002; Kuhlmann, 2018). No contexto da polinização, abelhas europeias ou africanizadas (*Apis mellifera*) e irapuás (*Trigona spinipes*) atuam como principais vetores, conforme documentado por Kuhlmann (2018). A floração da copaíba ocorre em diferentes períodos ao longo do ano, dependendo da região geográfica (Silvério

e lenza, 2010). Vale ressaltar que, no Estado de São Paulo, o florescimento não é um evento anual, conforme constatado por Crestana (1989). Em um contexto específico, na região de Alfenas, MG, constatou-se que cada árvore de copaíba permanece em fase de floração, em média, por dois meses (Carvalho, 2014).

A dispersão dos seus frutos e sementes adota predominantemente o mecanismo zoocórico, contando com a participação de aves e alguns mamíferos como agentes dispersores (Motta Junior e Lombardi, 2002). Entre as aves notáveis nesse processo, destacam-se o tucanuçu (*Ramphastos toco*), a gralha-do-campo (*Cyanocorax cristatellus*) e o sabiá-laranjeira (*Turdus rufiventris*), que ingerem o arilo e, posteriormente, regurgitam a semente, conforme observado por Motta Junior e Lombardi (2002). Além disso, o macaco muriqui (*Brachyteles arachnoides*) desempenha um papel significativo ao abrir o fruto para extrair o arilo da semente, sendo que, em muitas instâncias, a semente é ingerida e excretada nas fezes, caracterizando um processo de dispersão endozoocórica, conforme documentado por Traveset e Verdú (2002). O mesmo padrão de comportamento é observado no macaco-prego (*Cebus apella nigrinus*), como evidenciado por Oliveira *et al.*, (1995). Este processo evidencia a interação sinérgica entre a copaibeira e a fauna local, contribuindo para a disseminação eficiente de suas sementes na ecologia da comunidade vegetal circundante.

A copaibeira é importante por sua relevância socioeconômica, uma vez que o óleo resinoso extraído de sua casca, conhecido como óleo de copaíba, possui propriedades medicinais, sendo historicamente utilizado por comunidades indígenas e tradicionais na medicina tradicional (Fiedler *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2023). O óleo-resina, obtido a partir do tronco da árvore de copaíba, apresenta propriedades medicinais, cosméticas e industriais (Rigamonte *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2023).

Nesse sentido, houve uma progressão no entendimento generalizado acerca da utilização do óleo-resina de copaíba, suscitando interesse por parte da comunidade científica (Frazão *et al.*, 2023). Além disso, utiliza-se a mesma para aplicação comercial, sendo interesse das indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia (Mendonça; Alves; Santos, 2023). O aporte econômico oriundo da exploração do óleo desempenha um papel significativo no suprimento financeiro das comunidades locais, destacando-se, de forma emblemática, como um elemento proeminente nos ecossistemas tropicais. (Mendonça; Alves; Santos, 2023).

3.2.2 Pequizeiro

O pequizeiro apresenta porte arbóreo, crescendo geralmente como uma árvore frondosa, espalhada e de altura variável, chegando a alcançar 15 metros de altura nos cerrados de Minas Gerais. Nativo em cerradão distrófico e mesotrófico, cerrado denso, cerrado *stricto sensu* e cerrado ralo, sua espécie se adapta com facilidade aos distintos tipos de solo e de condição de crescimento

que são ocorrentes nestas regiões (Carvalho *et al.*, 2015). Seu fruto é do tipo drupa, com epicarpo espesso de coloração esverdeada. O mesocarpo externo exhibe uma textura coriácea, variando de coloração esbranquiçada a amarelada, enquanto o mesocarpo interno (polpa) possui uma tonalidade amarelada (Lopes *et al.*, 2016). O endocarpo, por sua vez, é revestido por espinhos e desempenha a função de proteger a amêndoa, localizada na região central do fruto (Gonçalves *et al.*, 2015; Bess *et al.*, 2020; Lopes *et al.*, 2020).

Os frutos do pequizeiro iniciam o processo de maturação em meados de novembro, estendendo-se até o início de fevereiro, abrangendo principalmente os estados do Centro-Oeste, Nordeste, Norte e partes do Sudeste, demandando aproximadamente três a quatro meses após o período de floração para atingirem a plena maturidade (Gribel, 1986). A cronologia da floração e frutificação do pequizeiro exhibe variações regionais, sendo mais precoce ao norte e mais tardia ao sul do Cerrado (Gomes *et al.*, 2023). Há registros de uma eventual antecipada, embora menos proeminente, manifestando-se nos meses de julho e agosto (Gribel, 1986).

O seu fruto é revestido por uma casca espessa e espinhosa, conferindo-lhe uma eficaz proteção contra potenciais predadores (Lopes *et al.*, 2016). Os espinhos, proeminentes na superfície do fruto, são distintivamente reconhecíveis, contribuindo para a identificação visual característica do pequi (Barroso *et al.*, 2020). A sua polpa é notável pela presença de óleos, os quais possuem diversas aplicações, incluindo o uso como condimentos, na fabricação de licores, na indústria de lubrificantes e na produção de produtos cosméticos, como sabão, sabonete, xampus e cremes (Lopes *et al.*, 2016). A literatura científica documenta teores elevados de carotenóides totais para o pequizeiro, embora apresentem notável variabilidade. Fraga *et al.*, (2023) relata em seu trabalho que os níveis de carotenóides totais variaram entre 7,25 mg por 100 g, influenciados pelo grau de maturação. Essa variação destaca a importância de considerar o estágio de maturidade ao avaliar a composição química dos frutos do pequizeiro.

As folhas são do tipo compostas folioladas, cada folíolo, em sua maioria, apresenta uma configuração elíptica ou lanceolada, caracterizando-se por margens crenada, vilosa em ambas faces ou às vezes subglabras na face adaxial (Lopes *et al.*, 2016; Rezende; Caixeta; Queiroz, 2023). A organização das folhas ao longo dos ramos contribui para a formação de uma folhagem densa. Essas folhas são ricas em taninos, classificados como polifenóis, uma categoria de substâncias orgânicas amplamente distribuída em diversas plantas e frutas (Pinto; Pereira; Firmo, 2019). As folhas se enquadram como coriáceas, atributo que favorece a resistência física da folha, proporcionando uma defesa eficaz contra fatores adversos do ambiente, contribuindo para a integridade e sobrevivência da planta em seu habitat natural (Rocha *et al.*, 2011; Pinto; Pereira; Firmo, 2019).

As flores do pequizeiro manifestam características hermafroditas, apresentando órgãos reprodutivos masculinos (estames) e femininos (ovário) dentro de uma mesma estrutura floral (Lopes *et al.*, 2016). A coloração das flores varia entre tons de amarelo e alaranjado (Almeida *et al.*, 1998; Lorenzi, 2000; Carvalho, 2009). A polinização da planta é predominantemente conduzida por insetos, notadamente abelhas e vespas, além de outros animais que desempenham um papel essencial nesse processo reprodutivo (Vasques; Costa; Leite, 2023). O pequizeiro desenvolve um sistema radicular profundo que permite a planta acessar água em camadas mais profundas do solo durante períodos de seca, evidenciando uma estratégia fisiológica que favorece a sobrevivência em um ambiente caracterizado por desafios sazonais relacionados à disponibilidade de água (Van Schaik *et al.*, 1993; Borchert *et al.*, 2004).

Gribel (1986) aborda em sua obra que os eventos fenológicos se manifestam predominantemente durante a estação seca, sendo que na estação chuvosa as atividades morfogênicas aparentemente cessam, à exceção do desenvolvimento e maturação dos frutos. O autor ainda relata que o fenômeno de queda de folhas tem início no início da estação seca, intensificando-se, de modo particular, nos meses de junho ou julho. Paralelamente ou imediatamente após a queda das folhas, observa-se a brotação de folhas novas e de botões. Cada ramo, em sua maioria, emite entre dois a três pares de folhas, associados a uma inflorescência terminal. Este padrão fenológico se mantém até o início da estação chuvosa, momento em que as folhas continuam seu desenvolvimento. A abertura dos botões florais ocorre aproximadamente um mês a um mês e meio após a emissão das inflorescências, marcando o início do processo reprodutivo da espécie (Gribel, 1986).

O pequizeiro é caracterizado como uma planta auto compatível, no entanto, produz mais frutos por meio de fecundação cruzada (Gribel; Hay, 1993). A taxa de germinação do pequi é notoriamente baixa e lenta, oscilando entre 20% e 30%, com um máximo de 60% o (Araújo, 1994; Sá-Carvalho *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 2004). A emergência das plântulas pode variar significativamente, abrangendo um período de 60 dias até um ano (Souza *et al.*, 2007; Lopes *et al.*, 2016). Pesquisas sugerem que a causa da dormência está vinculada à cobertura da semente, conhecida como endocarpo, caracterizando-se como uma dormência fisiológica (Dombroski *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2016). Quanto à germinação em condições naturais, ocorre em uma taxa bastante reduzida, atribuída à dormência das sementes e, possivelmente, à intervenção humana, que resulta na devastação do cerrado para expansão agropecuária e práticas de extrativismo predatório (Lopes *et al.*, 2016; Caldeira; Parré, 2020).

A utilização do pequi é tradicional e valorizada na cultura sertaneja (Oliveira, 2009). Sua exploração é de importância socioeconômica, agrupada em um conjunto de atividades, como

coleta, transporte, consumo do fruto *in natura* e derivados e a comercialização (Silva *et al.*, 2021). A exploração desse fruto é de forma sazonal, principalmente nas áreas rurais do norte de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso, com contribuição econômica dessa atividade e complemento de renda dos agricultores (Felfili *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2008). Diversas unidades familiares obtêm sua renda anual por meio da comercialização da fruta e do óleo do pequi, alcançando, em alguns casos, até 57% do montante total de seus ganhos (Gomes, 2000; Oliveira, 2006; Borges *et al.*, 2020).

A preservação do pequi mediante a aplicação da técnica de conserva representa uma modalidade de processamento que tem obtido notável reconhecimento nas regiões produtoras, inclusive ampliando sua presença no mercado de exportação (Cândido; Malafaia; Rezende *et al.*, 2012). A produção do pequi em conserva adere as técnicas de fabricação comumente empregadas para outros produtos preservados, como palmito e azeitona, aderindo estritamente às normas e limites regulamentares referentes a aditivos alimentares (Rodrigues *et al.*, 2020; Faleiro *et al.*, 2022). Além de seu emprego na produção de óleo, licor e conserva, a polpa do pequi serve como matéria-prima na confecção de uma diversidade de produtos. Entre eles, destacam-se doces, bolos, farinhas, temperos (em forma líquida ou em tabletes), cosméticos, sabão artesanal, sucos e sorvetes (Rodrigues *et al.*, 2020). Essa variedade de aplicações ressalta a versatilidade do pequi como recurso na indústria alimentícia e em diversos setores, contribuindo para o seu aproveitamento econômico e valorizando suas propriedades sensoriais e nutricionais (Benevides *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2011; Kuhlmann, 2018).

3.3 Diversidade genética em espécies florestais

As explorações encontram-se ameaçadas por alguns fatores, como a erosão genética e técnicas de propagação (Gonçalves *et al.*, 2010). A exploração bem gerenciada pode, paradoxalmente, resultar em conservação (Ronchi; Coutinho; Bonfim, 2022). A implementação de práticas de manejo, que incluem colheita seletiva, preservação de habitats críticos e o estabelecimento de áreas de proteção, pode contribuir para a preservação da variabilidade genética (Sabogal *et al.*, 2006; Ronchi; Coutinho; Bonfim, 2022). Uma opção para minimizar tais problemáticas é um melhor conhecimento dos recursos genéticos da região, contribuindo assim para sua conservação (Jepson, 2005; Ferreira *et al.*, 2016).

No sentido de conservação de plantas de contexto florestal, é importante que se mantenha o nível de diversidade genética encontrado nas populações naturais. Saber como essa variabilidade está distribuída dentro das populações é de suma importância para o não comprometimento da perpetuação da espécie, o procedimento da conservação envolve a realização de estudos genéticos, análises de diversidade genética e monitoramento de parâmetros populacionais ao longo do tempo

(Botrel; Carvalho, 2004).

O estudo de diversidade genética é um campo utilizado para pesquisas de estratégias de conservação, levantamentos e monitoramentos de populações, critérios de listas de extinção, e no manejo das populações naturais (Hmeljevski *et al.*, 2011; Reis *et al.*, 2012). Este campo de estudos é importante para a sobrevivência das populações de espécies arbóreas às intempéries do meio e faz-se necessária cada vez mais, tendo em vista que, quanto maior a variabilidade genética, maior é o potencial de adaptação frente a mudanças ambientais (Townsend *et al.*, 2010). Ao compreender a diversidade genética de espécies florestais, pode-se desenvolver estratégias de conservação mais eficazes, como a proteção de áreas naturais e a implementação de programas de reprodução e reintrodução de espécies em risco (Cogo *et al.*, 2020; Rosa *et al.*, 2021). A diminuição da diversidade genética pode resultar na erosão genética, ocasionando maior susceptibilidade das populações a doenças, perturbações ambientais e outros elementos adversos. (Rosa *et al.*, 2021).

A diversidade genética desempenha um papel significativo na avaliação comparativa de sistemas de conservação *in situ* e *ex situ*. Isso é realizado mediante a análise das variações entre populações mantidas em seus ambientes naturais e em condições controladas fora deles, conforme destacado por Santos (2009). Além disso, a diversidade é instrumental na comparação entre distintos sistemas de manejo, contribuindo para a delimitação de unidades de interesse (Novello *et al.*, 2018; Zechini *et al.*, 2018). A aplicação da diversidade genética estende-se ao monitoramento e manejo de áreas, como destacado por Frankham (2010). Adicionalmente, a diversidade genética pode ser incorporada em estratégias de otimização visando conservar a máxima riqueza e diversidade genética com o menor consumo de recursos possível, conforme sugerido por Diniz-Filho *et al.* (2016).

A variabilidade genética da Copaibeira e do Pequizeiro pode ser estudada por meio de diferentes marcadores moleculares, como SSR (Simple Sequence Repeat) e RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), que permitem a identificação de variações no DNA de diferentes populações, possibilitando a análise da diversidade genética e a identificação de padrões geográficos de distribuição da variabilidade (Mondini *et al.*, 2009). Estas análises envolvem várias etapas. Inicialmente, amostras de DNA são coletadas de diferentes populações da espécie em estudo. O DNA é extraído e amplificado usando primers, que visam locais no genoma. Os produtos amplificados são então separados por eletroforese, gerando padrões de bandas únicos para cada amostra. A análise desses padrões permite comparar a variabilidade genética entre populações. Técnicas estatísticas, como análise de agrupamento ‘Hierárquico’ e ‘Otimização de Tocher’, são aplicadas para quantificar e comparar a diversidade genética, permitindo a identificação de padrões geográficos (João *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2023). Os resultados fornecem insights sobre a

estrutura populacional, migração histórica e influências ambientais na variabilidade genética, contribuindo para uma compreensão mais aprofundada das populações naturais estudadas.

A região norte e noroeste de Minas Gerais carece de estudos abrangentes sobre a diversidade genética da copaibeira e do pequizeiro. A ausência de investigações específicas nessa área representa uma lacuna significativa no conhecimento científico sobre elas, impedindo uma compreensão abrangente de sua distribuição e estrutura genética nessas áreas, apresentando estudos normalmente no estado do Mato Grosso e algumas regiões do norte de Minas Gerais (Melo Júnior *et al.*, 2004, Maltezo; Medeiros e Rossi, 2021).

3.4 Oligonucleotídeos ISSR aplicados a estudos de diversidade

Os marcadores moleculares são ferramentas utilizadas para o gerenciamento de recursos genéticos, caracterização e avaliação da diversidade genética dentro e entre populações, seleção assistida, clonagem e mapeamento apresentando alta eficiência para os programas de estudo de diversidade genética (Matsumura *et al.*, 2015; Oliveira, 2018; Aguilar *et al.*, 2020). Alguns marcadores moleculares disponíveis atualmente, oferecem uma ampla capacidade de amostragem no genoma, possibilitando de maneira automatizada e a custos reduzidos a análise de um conjunto diversificado de indivíduos. As discrepâncias entre esses indivíduos são obtidas por meio da detecção de variações presentes no DNA, caracterizadas como polimorfismos genéticos. Essa abordagem molecular torna-se um instrumento para estudos de variabilidade genética, relevante para investigações filogenéticas e evolutivas, bem como para aplicações práticas em programas de melhoramento genético e na gestão de bancos de germoplasma. A eficiência dessa metodologia foi ressaltada por Guimarães *et al.* (2009) e Toppa e Jadoski (2013), consolidando seu potencial na avaliação abrangente da diversidade genética em diferentes contextos biológicos.

A varredura de amplicons em genomas por meio de oligonucleotídeos ISSR é uma técnica molecular utilizada para analisar a variabilidade genética de organismos. Seu embasamento ocorre através da amplificação de regiões entre sequências de repetição simples usando oligonucleotídeos ISSR (Hadeithi; Jasim, 2021). Esses oligonucleotídeos são curtos e possuem sequências de bases que são complementares a regiões repetitivas presentes no genoma, permitindo assim que sejam amplificadas por PCR (Polymerase Chain Reaction). Através da amplificação dos amplicons gerados pela PCR, pode-se analisar a variabilidade genética presente em um organismo. Para análise de espécies vegetais, essa técnica é especialmente útil, pois como outros organismos, estes apresentam regiões repetitivas em seus genomas (Rosa *et al.*, 2021).

Os ISSRs foram desenvolvidos a partir da necessidade de explorar repetições microssatélites sem a utilização de sequenciamento do DNA (Zietkiewicz; Rajalski; Labuda, 1994). Com isso, vários projetos que possuem como objetivo o estudo de diversidade genética, vêm utilizando os

oligonucleotídeos ISSR, que se destacam pela independência de informações prévias do genoma (Santana *et al.*, 2011). Entretanto, possuem como desvantagem a natureza dominante, que pode ser compensada pelo aumento do número de locos amplificados (Zietkiewicz; Rajalski; Labuda, 1994; Godwin *et al.*, 1997). Os oligonucleotídeos ISSRs amplificam as regiões entre sequências microssatélites, amplamente utilizados em estudos de estruturas populacionais (Ng; Tan, 2015).

Os SSRs (Simple Sequence Repeats), conhecidos como microssatélites, desempenham um papel crucial na obtenção dos ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) (Zietkiewicz; Rajalski; Labuda *et al.*, 1994). A contribuição dos SSRs reside na sua abundância nos genomas, fornecendo sítios ideais para o design de primers específicos (Buso *et al.*, 2003). A utilização desses primers SSR na técnica ISSR permite amplificar regiões genômicas flanqueadas por sequências repetitivas, sem a necessidade prévia de identificar microssatélites específicos (Mullis; Faloona, 1987). Isso confere aos ISSRs uma versatilidade notável em estudos genéticos, especialmente quando a informação prévia sobre as sequências de microssatélites é limitada ou desconhecida (Turchetto-Zolet *et al.*, 2017).

Além disso, a importância evolutiva das repetições simples nos genomas é evidente. Microssatélites são locais altamente mutáveis, sujeitos a taxas elevadas de *slippage*, recombinação, adaptação e regulação gênica, contribuindo para a variabilidade genética nas populações (Wierdl *et al.*, 1997; Harr *et al.*, 1998; Buschiazzo; Gemmell, 2006). Essa variabilidade é fundamental para processos evolutivos, incluindo adaptação a ambientes em mudança, diferenciação populacional e especiação (Cogo *et al.*, 2020). Portanto, a presença generalizada de SSRs nos genomas representa uma fonte essencial de variabilidade genética e desempenha um papel central na abordagem eficaz da técnica ISSR na avaliação e caracterização da diversidade genética em estudos evolutivos e populacionais (Zietkiewicz; Rajalski; Labuda *et al.*, 1994; Jesus *et al.*, 2020).

O ISSR produz bandas mais confiáveis e reprodutíveis quando comparado a outro marcador dominante, como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), devido à temperatura de anelamento e acesso a um maior número de sequências (Yang *et al.*, 2011). Os marcadores ISSR apresentam uma técnica rápida, eficiente e que não requer informação prévia do sequenciamento do genoma do organismo em estudo, podendo ser utilizados em várias espécies (Turchetto *et al.*, 2017; Felix *et al.*, 2020). Estes, são segmentos de ácidos nucléicos sintéticos, necessários para o início da amplificação do DNA, constituídos geralmente por 15 a 20 bases nitrogenadas, em fita simples. A variação gradual de temperatura (gradiente de temperatura) nesses segmentos é crucial para otimizar as condições de hibridização, garantindo uma replicação seletiva e precisa do material genético. (Zietkiewicz; Rajalski; Labuda, 1994; Chagas *et al.*, 2015).

Os tamanhos dos fragmentos amplificados variam de 200 a 2000 pb e apresentam na grande

maioria alta reprodutibilidade, devido, possivelmente, ao uso de iniciadores longos, que são capazes de, em uma única reação de PCR, reconhecer múltiplos locos no genoma para amplificar principalmente as sequências inter microssatélites de diferentes tamanhos (Zietkiewicz; Rajalski; Labuda, 1994). Devido à sua ampla aplicabilidade em estudos genéticos, os marcadores moleculares têm se mostrado eficazes na determinação da diversidade genética de populações naturais (Abdul; Muneer, 2014). A coleção disponibilizada University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada) refere-se a uma série de oligonucleotídeos, desenvolvidos como marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), desenvolvidos pela Universidade da Colúmbia Britânica, Canadá (Cuchi *et al.*, 2023).

A ploidia da copaibeira e do pequizeiro têm sido objeto de estudos recentes, fornecendo insights cruciais para a compreensão de sua diversidade genética e adaptação ambiental, aspectos fundamentais para estratégias efetivas de conservação e manejo sustentável (Santos *et al.*, 2018; Maltezo; Medeiros e Rossi, 2021). Para a Copaibeira, é fundamental adotar práticas como a colheita seletiva, visando a extração controlada do óleo-resina, evitando danos excessivos às árvores e promovendo a regeneração natural. Além disso, a implementação de planos de manejo que definam ciclos de exploração, considerando as características ecofisiológicas da espécie, é crucial (Maltezo; Medeiros e Rossi, 2021). No caso do pequizeiro, estratégias operacionais devem ser orientadas para a colheita sustentável dos frutos, promovendo a dispersão eficiente de sementes e preservando as árvores maduras (Xavier *et al.*, 2007). O estabelecimento de áreas de conservação, aliado à educação ambiental e ao envolvimento das comunidades locais, contribui para a proteção dessas espécies e dos ecossistemas associados (Silva; Anunciação, 2023). A pesquisa contínua para avaliar os impactos das práticas de manejo, monitorar as populações e ajustar as estratégias conforme necessário é imperativa para assegurar a sustentabilidade a longo prazo dessas importantes espécies arbóreas na região (Souza *et al.*, 2023).

4. REFERÊNCIAS

ABDUL-MUNEER, P. M. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. **Genet. Res. Int.**, v. 2014, p. 1-11, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3997932/>>. Acesso em: 18 jan. 2024.

AGUILAR, A. Y. *et al.* Uso de marcadores moleculares para determinar a variabilidade genética no papa (*solanum tuberosum*). **Puriq**, v. 2, n. 2, 2020. Disponível em: <<https://shs.hal.science/halshs-02554548v1/document>>. Acesso em 18 jan. 2024.

AL-HADEITHI, Z. S. M.; JASIM, S. A. Study of Plant Genetic Variation through Molecular Markers: An Overview. **Journal of Pharmaceutical Research International**, v. 33, n. 45, pág. 464-473, 2021. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/355209378_Study_of_Plant_Genetic_Variation_thro

ugh_Molecular_Markers_An_Overview>. Acesso em 05 jan. 2024.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. Cerrado: espécies vegetais úteis. **Planaltina: Embrapa- CPAC**, 1998.

ARAÚJO, F. D. The ecology, ethnobotany and management of *Caryocar brasiliense* Camb. around Montes Claros, MG, Brasil. 1994. 175p. Tese (Doutorado) - University of Oxford, Oxford.

ATAÍDE, T. H. *et al.* PEQUI do cerrado ao Bistrô. Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – CES/JF. **Revista de Gastronomia**, 2019. Disponível em: <<https://seer.uniacademia.edu.br/index.php/revistadegastronomia/article/view/1864/1204>>. Acesso em 10 jan. 2024.

BARROSO, N. G. *et al.* Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) – Uma revisão. In: VERRUCK, S. Avanços em ciência e tecnologia de alimentos. Guarujá, v. 2, **Científica Digital**, 2020. Disponível em: <<https://www.editoracientifica.com.br/artigos/pequi-caryocar-brasiliense-camb-uma-revisao>>. Acesso em 20 dez. 2023.

BATLLE-BAYER, L.; BATJES, N. H.; BINDRABAN, P. S. Changes in organic carbon stocks upon land use conversion in the Brazilian Cerrado: A review. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 137, p. 47-58, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016788091000037X>>. Acesso em 02 jan. 2024.

BENEVIDES, S. D. *et al.* Processamento de Queijo de Coalho de Leite de Cabra Adicionado de Óleo de Pequi. Embrapa Comunicado Técnico, v. 103, p. 1–6, 2009.

BESS, J. *et al.* Biometric and physical-chemical analysis of pequis collected in the state of Mato Grosso. **Scientific Electronic Archives**, v. 13, p. 24, 2020. Disponível em: <<https://sea.ufr.edu.br/SEA/article/view/1246>>. Acesso em 23 dez. 2023.

BORCHERT, R. *et al.* Environmental control of flowering periodicity in Costa Rican and Mexican tropical dry forests. **Global Ecology and Biogeography**, v.13, n.5, p.409-425, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1466-822X.2004.00111.x>>. Acesso em 05 jan. 2024.

BORGES, D. M. L. *et al.* A comercialização de Produtos do Agroextrativismo em Feiras Livres do Alto Jequitinhonha. **Campo-território: revista de geografia agrária**, p. 325-356, 2020. Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/45374/2/A%20comercializa%20c3%a7%20c3%a3o%20de%20produtos%20do%20agroextrativismo%20em%20feiras%20livres%20do%20Alto%20Jequitinhonha.pdf>>. Acesso em: 01 abr. 2023.

BOTREL, M. C.; CARVALHO, D. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de jacarandá paulista (*Machaerium villosum* Vog.), **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.4, p.621-627, 2004. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbb/a/LgPjBSS8qVPhNMNHWWtQnQC/?format=pdf&lang=pt>>. Acesso em 02 jan. 2024.

BRAGA, M. N. S. *et al.* Estudo etnobotânico de plantas medicinais da família fabaceae na comunidade cristolândia, Humaitá-AM. **Biodiversidade**, v. 21, n. 2, 2022. Disponível em: <<https://periodicoscientificos.ufmt.br/ojs/index.php/biodiversidade/article/view/14139>>. Acesso em 8 jan. 2024.

BUSCHIAZZO, E.; GEMMELL, N. J. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. **Bioessays**, v. 28, n. 10, p.1040-50, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16998838/>>. Acesso em 18 jan 2024.

BUSO, G. S. C. *et al.* Marcadores microssatélites em espécies vegetais. **Biotechnol. Cienc. Desenvol.**, v. 6, p. 46-50, 2003. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/272785272_Marcadores_Microssatelites_em_Especie_s_Vegetais>. Acesso em 05 jan. 2023.

CABALLERO, A.; RODRÍGUEZ-RAMILO, S. T.; ÁVILA, V.; FERNÁNDEZ, J. Management of genetic diversity on subdivided populations in conservation programmes. **Conservation Genetics**, v. 11, p. 409 – 419, 2010.

CALDEIRA, C.; PARRÉ, J. L. Diversificação agropecuária e desenvolvimento rural no bioma cerrado. **Revista Americana de Empreendedorismo e Inovação**, v. 2, n. 1, p. 344-359, 2020.

CÂNDIDO, P. A.; MALAFAIA, G. C.; REZENDE, M. L. A exploração do pequi na região norte de Minas Gerais: abordagem por meio do Sistema Agroalimentar Localizado. *In: IDeAS. Programa de Pós-Graduação de Ciências Sociais em Desenvolvimento, Agricultura e Sociedade*. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, p. 1-21, 2012.

CARVALHO, L. S. *et al.* Características Botânicas, Efeitos Terapêuticos e Princípios Ativos Presentes No Pequi (*Caryocar brasiliense*). **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, v. 19, n. 2, p. 147-157, 2015.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras Copaíba**. Embrapa, 2014.

CARVALHO, P. E. R. Pequizeiro - *Caryocar brasiliense*. Colombo: Embrapa Florestas. Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2009. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/578664/1/CT230.pdf>>. Acesso em 02 jan. 2024.

CHAGAS, K. P. T. *et al.* Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineensis*. **Agrária - Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, p. 147-152, 2015. Disponível em: <<http://www.agraria.pro.br/ojs32/index.php/RBCA/article/view/v10i1a5133/614>>. Acesso em: 22 abr. 2023.

CHARLESWORTH, B. Fundamental concepts in genetics: Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 3, p. 195–205, 2009. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrg2526>>. Acesso em 18 dez. 2023.

COGO, M. R. D. M. *et al.* The genus *Butia* (Arecaceae) with emphasis on the species *Butia exilata* and *Butia lallemantii*: a review. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 12, 2020. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/10675>>. Acesso em 17 jan. 2024.

CRESTANA, C. M.; BELTRATI, C. M. Morfologia e anatomia das sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Naturalia**, v. 13, n. 1, p. 45-54, 1989.

CRESTANA, C. S. M.; KAGEYAMA, P. Y. Biologia de polinização de *Copaifera Langsdorffii* Desf. (Leguminosae-caesalpinioideae), o "oleo-de-copaiba". **Revista do Instituto Florestal**, v. 1, n. 1, p. 201-214, 1989.

CUCHI, G. *et al.* Caracterização molecular de etnovariedades de *Manihot esculenta* Crantz com utilização de marcadores moleculares ISSR. **Conjecturas**, v. 22, n. 13, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.53660/CONJ-1705-2H70>>. Acesso em 27 dez. 2023.

DIAS, N. D. S. C. *et al.* Characterization and selection of ISSR molecular markers in species of *Passiflora* spp. **Multi-Science Journal**, v.3, n.3, p. 17-22, 2020. Disponível em: <<https://periodicos.ifgoiano.edu.br/multiscience/article/view/1290>>. Acesso em 03 jan. 2024.

DINIZ-FILHO, J. A. F.; DINIZ, J. V. B. P. L.; TELLES, M. P. C. Exhaustive search for conservation networks of populations representing genetic diversity. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2016.

DOMBROSKI, J. L. D.; PAIVA, R.; ALVES, J. M. C.; SANTOS, B. R.; NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, P. D. O.; BARBORA, S. Métodos para a superação da dormência fisiológica de *Caryocar brasiliense* Camb. **Cerne**, 16(2), 131-135, 2010.

FALEIRO, F. G. *et al.* Banco ativo de germoplasma de pitayas da Embrapa: conservação, caracterização e uso no melhoramento genético e desenvolvimento de sistemas de produção. **Revista RG News**, v. 8, p. 1, 2022.

FALEIRO, F. G. Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina – DF, **Embrapa Cerrados**, p. 102, 2007.

FELFILI, J. M.; RIBEIRO, J. F.; BORGES FILHO, H. C.; VALE, A. T. Potencial econômico da biodiversidade do Cerrado: estado atual e possibilidades de manejo dos recursos da flora. In: AGUIA, L. M.; CAMARGO, A. J. A. **Cerrado: ecologia e caracterização**. Embrapa Cerrados, 2004.

FELIX, F. C. *et al.* Aplicações de Marcadores ISSR em Estudos de Diversidade Genética de *Pityrocarpa moniliformis*. **Revista Caatinga**, v. 33, n. 4, p. 1017-1024, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1983-21252020v33n417rc>>. Acesso em 05 jan. 2024.

FERREIRA, L. C.; MORAES, F. A.; MELO, C. P. O.; GARCIA, E. M.; TAROCO, H. A.; MELO, J. O. F. Água como tema central na educação ambiental. **Scientific Electronic Archives**, v. 9, n. 2, p. 67-72, 2016.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **Embrapa-Cenargen**, p. 200, 1998.

FERREIRA, S. M. R.; BARTACHEVITS, E. L. F. Sociobiodiversity and Sovereignty and Food and Nutritional Security as an inseparable right to adequate and healthy food. **Health Sciences**, v. 11, n. 1, 2022. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/25161>>. Acesso em: dez. 2023.

FIEDLER, N. C.; SOARES, T. S.; SILVA, G. F. Produtos Florestais Não Madeireiros: Importância e Manejo Sustentável da Floresta. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 10, n. 2, p. 264-278, 2008.

FRAGA, B. *et al.* Carotenóides e estabilidade oxidativa do óleo da polpa de *Caryocar brasiliense* Camb. efeito da remoção assistida por ultrassom. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 12, n. 5, p. 5112541372-e5112541372, 2023.

FRANKHAM, R. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation.

Biological Conservation, v. 143, n. 9, p. 1919–1927, 2010.

FRAZÃO, D. R. *et al.* Evaluation of the biological activities of Copaiba (*Copaifera* spp): a comprehensive review based on scientometric analysis. **Front Pharmacol**, 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37719866/>>. Acesso em: 10 jan. 2024.

GARCIA, D. C. F. *et al.* Análise da Diversidade Genética do Baru usando Marcadores Moleculares ISSR. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 48949-48960, 2020. Disponível em: <<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/13585>>. Acesso em 02 jan. 2024.

GODWIN, I. D.; AITKEN, E. A. B.; SMITH, L. W. Application of inter simple sequence repeat (issr) markers to plant genetics. **Electrophoresis**, v.18, p. 1524- 1528, 1997. Disponível em: <<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.1150180906>>. Acesso em 08 jan. 2024.

GOMES, B. H. *et al.* Genetic diversity and correlation between morphological traits of pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb.) with and without thorns at the endocarp. **Na Acad Bras Cienc**, v. 94, 2022. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/aabc/a/NHngf4Wv7mybBccKyHScg9c/?format=pdf&lang=en>>. Acesso em: 01 jan. 2024.

GOMES, C. J. Extrativismo e biodiversidade: o caso da fava d’anta. **Ciência Hoje**, n. 27, p. 66-69, 2000.

GOMES, M. V. F. *et al.* A resposta produtiva do pequi às condições climáticas em uma região do Cariri Cearense. **Observatório de la economía latinoamericana**, v. 21, n. 6, p. 4404-4426, 2023.

GONÇALVES, K. G.; DUARTE, G. S. D.; TSUKAMOTO FILHO, A. A. Espécies frutíferas do cerrado e seu potencial para os safes. **Vegetação e Etnobotânica**, v. 1, n. 7, p. 64-79, 2015.

GRIBEL, R. **Ecologia da polinização e da dispersão de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) na região do Distrito Federal**, p. 109, 1986. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília.

GRIBEL, R.; HAY, J. D. Pollination ecology of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) in Central Brazil cerrado vegetation. **Journal of Tropical Ecology**, v. 9, p. 199-211, 1993.

GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V.; LANZA, M. A.; SCHUSTER, I. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, v. 30, n. 253, p. 24-33, 2009.

HARR, B.; ZANGERL, B.; BREM, G.; SCHLOTTERER, C. Conservation of locus specific microsatellite variability across species: a comparison of two *Drosophila* sibling species *D. melanogaster* and *D. simulans*. **Mol. Biol. Evol**, v. 15, n. 2, p. 176-184, 1998.

HMELJEVSKI, K. V. *et al.* Genetic diversity, genetic drift and mixed mating system in small subpopulations of *Dyckia ibiramensis*, a rare endemic bromeliad from Southern Brazil. **Conservation Genetics**, v. 12, n. 3, p. 761–769, 2011.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Biomass e Sistema Costeiro - Marinha do Brasil**. Brasília, 2019.

Instituto Sociedade População e Natureza – ISPN. **Biomass, fauna e flora do cerrado**, 2021. Disponível em: <<https://ispn.org.br/biomass/fauna-e-flora-do-cerrado/>>. Acesso em 11 jan. 2024.

JEPSON, W. A. Disappearing biome? Reconsidering land-cover change in the Brazilian savanna. **The geographical journal**, v. 171, n. 2, p. 99-111, 2005.

JESUS, A. A. *et al.* Ferramentas moleculares no melhoramento genético de *Megathyrus maximus* para o semiárido: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e7839108675-e7839108675, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.33448/rsd-v9i10.8675>>. Acesso em 18 jan. 2024.

JOÃO, S. *et al.* Ferramentas moleculares para a seleção de cultivares de amendoeira com teor de vitamina E diferenciador. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 46, n. 2, p. 144-153, 2023.

JUNIOR, V. V.; PINTO, A. C. O gênero *copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, p.273-286, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000200016>>. Acesso em 10 jan. 2024.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Revista Megadiversidade**, v. 1, p. 147-155, 2005.

KUHLMANN, M. **Frutos e sementes do Cerrado: espécies atrativas para a fauna**. v. 2. 1. ed. Brasília: M. K. Peres, p. 464, 2018.

LISBOA, M. C. *et al.* Oleochemistry potential from Brazil northeastern exotic plants. **Biochime**, v. 178, p. 96-104, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030090842030208X>>. Acesso em: 08 dez. 2023.

LITT, M.; LUTY, J. A. A Hypervariable Microsatellite Revealed by In Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 397–401, 1989.

LOPES, P. S. N. *et al.* *Caryocar brasiliense*: pequi. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Centro-Oeste**, 2016.

LOPES, T. S. *et al.* Intervention in Sete Lagoas about the Cerrado biome. **Scientific Electronic Archives**, v. 13, p. 71-75, 2020.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v. 1, p. 368, 2008.

MARTINI, A. *et al.* **Espécies madeireiras da Amazônia potencialmente ameaçadas**. Belém: Imazon, p. 34, 1998.

MARTINS, J. P. G. *et al.* Study of pequi peel pyrolysis: Thermal decomposition analysis and product characterization. **Biomass and Bioenergy**, v. 149, 2021. Disponível em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096195342100132X>>. Acesso em: 04 jan. 2024.

MATSUMURA, E. E. *et al.* Composition and activity of endophytic bacterial communities in field-grown maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Annals of microbiology**, v. 65, n. 4, p. 2187-2200, 2015. Disponível em: <<https://annalsmicrobiology.biomedcentral.com/articles/10.1007/s13213-015-1059-4>>. Acesso

em: 22 mar. 2023.

MELO JÚNIOR, A. F. *et al.* Estrutura genética de populações naturais de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia Florestalis**, v.1, n. 66, p. 56-65, 2004.

MENDONÇA, B. M. R.; ALVES, P. E.; SANTOS, E. P. Cosméticos Verdes: revisão bibliográfica acerca da tendência sustentável no desenvolvimento de cosméticos. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 2, p. e4212239888-e4212239888, 2023.

MONDINI, L., NOORANI, A., A. PAGNOTTA, M. Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools. **Diversity**, v. 1, p. 19-35, 2009.

MORILLO, A. C.; MORA, M. S.; MORILLO, Y. Análise da diversidade genética da fruta do dragão com base em marcadores ISSR na Colômbia. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1519-6984.256451>>. |Acesso em 04 jan. 2024.

MOTTA-JUNIOR, J. C.; LOMBARDI, J. A. Galeria no Complexo do Cerrado, Brasil. **Biotemas**, v. 15, n. 1, p. 59-81, 2002.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis os DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol.** v. 55, p. 335-350, 1987.

NEI, M. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York, 1987.

NG, W. L.; TAN, S. G. Marcadores Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR): Estamos fazendo certo?. **Revista Científica ASM**, v. 9, n. 1, p. 30-39, 2015.

NOVELLO, M. *et al.* Genetic conservation of a threatened Neotropical palm through community-management of fruits in agroforests and second-growth forests. **Forest Ecology and Management**, v. 407, p. 200–209, 2018.

OLIVEIRA, A. T. M. *et al.* Estrutura e síndromes de dispersão da vegetação arbórea em floresta nativa e agrofloresta, na Amazônia meridional. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 43, n. 3, p. 352-362, 2020. Disponível em: <<https://revistas.rcaap.pt/rca/article/view/19602>>. Acesso em 5 jan. 2024.

OLIVEIRA, C. S.; NUNES, G. L. E.; COUTINHO, M. P.; PEIXOTO, N.; GATTO, A. Aspectos Socioambientais da Comercialização. **Floresta e Ambiente**, n.2, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/2179-8087.058213>>. Acesso em 07 jan 2024.

OLIVEIRA, E. Exploração de espécies nativas como uma estratégia de sustentabilidade socioambiental - o caso do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) em Goiás. [doutorado] Brasília: Universidade de Brasília, 2006.

OLIVEIRA, E. N. A.; SANTOS, D. da C.; MARTINS, J. N.; BEZERRA, L. C. N. de M. Obtenção e caracterização de margarina convencional e light à base de óleo de pequi. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 294–304, 2011.

OLIVEIRA, L. B. Comparação entre marcadores eric, box e vntrs visando estudos populacionais de *Xanthomonas phaseoli* PV Manihotis, agente causal da bacteriose da mandioca, 2018.

OLIVEIRA, M. E. B. *et al.* Aspectos agrônômicos e de qualidade do pequi. Embrapa Agroindústria Tropical, 2008.

- OLIVEIRA, P. S. *et al.* A limpeza de sementes por formigas *Mycocepurus goeldii* (Attini) facilita a germinação em *Hymenaea courbaril* (Caesalpiniaceae). **Biotropica**, p. 518-522, 1995.
- PEDRONI, F.; SANCHEZ, M.; SANTOS, F. A. M. Fenologia da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.- Leguminosae, Caesalpinoideae) em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 25, p. 183-194, 2002.
- PEREIRA, A.V.; PEREIRA, E. B. C.; SILVA, D. B.; GOMES, A. C.; SOUSA-SILVA, J. C. Efeitos do tempo de imersão, da concentração de ácido giberélico e da planta matriz na germinação de pequi. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, n. 18. Florianópolis, SC. Anais. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2004.
- PIERI, F. A.; MUSSI, M. C. M.; MOREIRA, M. A. Óleo de Copaíba (*Copaifera* sp.): Histórico, Extração, Aplicações Industriais e Propriedades Medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbpm/a/54wyKL9fqFpDcfSpshDVv5G/?format=pdf>>. Acesso em 5 jan. 2024.
- PIMENTA, J. M. A. *et al.* Selection of ISSR Molecular Primers For Studies of Genetic Diversity In *Handroanthus Impetiginosus* (Mart. Ex Dc.) Mattos. **Revista Caatinga**, v. 35, n. 1, p. 231-238, 2022. Disponível em: <<https://periodicos.ufersa.edu.br/caatinga/article/view/9903>>. Acesso em 5 jan. 2024.
- PINTO, D. K. B.; PEREIRA, C. Z. K. P. C.; FIRMO, W. C. A. Estudo dos aspectos da espécie vegetal *Caryocar brasiliense* (pequi). **Natureza online**, v. 18, n. 1, p. 022-027, 2019.
- REIS, M. S. *et al.* Distribuição da diversidade genética e conservação de espécies arbóreas em remanescentes florestais de Santa Catarina. In: VIBRANS, A. C. *et al.* (eds.) **Inventário florístico florestal de Santa Catarina**. Diversidade e Conservação dos remanescentes florestais. Edifurb, v. 1, p. 143-169, 2012.
- REZENDE, A. L.; CAIXETA, M.; QUEIROZ, V. Análise morfológica dos frutos de interesse agrônomo no cerrado de Luziânia, Goiás (Agronomia). **Repositório Institucional**, v. 1, n. 1, 2023.
- RIBEIRO, J. F. *et al.* Usos múltiplos da biodiversidade no Cerrado: estratégia sustentável para a sociedade, o agronegócio e os recursos naturais. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L. (eds.) **Savanas: desafios, estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais**. Embrapa Cerrados, p. 337-360, 2008.
- RIGAMONTE, A. O. C. *et al.* Potencial de produção de óleo-resina de copaíba (*Copaifera* sp.) de populações naturais do sudoeste da Amazônia. **Revista Árvore**, v. 30, n. 4, p. 583-91, 2006.
- ROCHA, W. S. *et al.* Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 1215-1221, 2011.
- RODRIGUES, J. D. L. *et al.* Óleos, plantas e frutas do bioma cerrado utilizado na alimentação humana. **Perspectivas Experimentais e Clínicas, Inovações Biomédicas e Educação em Saúde (PECIBES)**, v. 7, n. 1, p. 2-12, 2021.
- RODRIGUES, N. *et al.* Azeitona de mesa, da tradição à inovação de produtos. **Tecnoalimentar**, v. 22, p. 10-11, 2020.

RONCHI, H. S.; COUTINHO, E. T.; BONFIM, F. P. G. Espécies alimentícias e medicinais nativas: produtos florestais não madeireiros e potencial de exploração sustentável. *Ciência Florestal*, v. 32, n. 3, p. 1149-1164, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.5902/1980509834747>>. Acesso em 18 jan. 2024.

ROSA, L. Z. *et al.* The importance of hybridization for the preservation of the genetic variability of the Arecaceae family (palms) against anthropogenic factors: a review over the case of the palm x *Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorste. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, 2021.

RUSSO, G. A. *et al.* Teores de nutrientes em solo e folhas de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) em diferentes fitofisionomias. **Revista Forestal Mesoamericana Kurú**, v. 19, n. 45, p. 85-90, 2022.

SABOGAL, C. *et al.* **Manejo florestal empresarial na Amazônia Brasileira**. Cifor, 2006.

SÁ-CARVALHO, C. G.; CÔRTEZ, R. A.; CARNEIRO, I. F.; BORGES, J. D. Efeito de diferentes tratamentos na germinação do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Acta Botanica Brasilica**, v. 1, n. 8, p. 109-120, 1994.

SANTANA, I. B. B. *et al.* Variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 868-876, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452011005000090>>. Acesso em: 22 mar. 2023.

SANTOS, J. S. *et al.* Análise da diversidade genética de milhos crioulo (*Zea mays* L.) do Norte de Mato Grosso. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 16, n. 2, p. 1-16, 2023.

SANTOS, K. L. Diversidade cultural, genética e fenotípica da goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*): implicações para a domesticação da espécie. [S.I.] Universidade de Santa Catarina, 2009.

SANTOS, P. H. R. *et al.* Genetic divergence in populations of *Caryocar brasiliense* Camb. from the physical characteristics of the fruits. **Revista Árvore**, v. 42, p. e420116, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1806-90882018000100016>>. Acesso em 20 jan. 2024.

SCHIASSI, M. C. E. V.; SOUZA, V. R.; LAGO, A. M. T.; CAMPOS, L. G.; QUEIROZ, F. Fruits from the Brazilian Cerrado region: Physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation. **Food Chemistry**, v. 245, p. 305- 311, 2018.

SILVA, F. H. L. *et al.* Procedências, matrizes e diâmetro do tronco na expressão de variáveis químicas em frutos de pequi. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10(1), p. 9-134, 2015.

SILVA, F. H. L.; FERNANDES, J.S.C.; ESTEVES, E.A.; TITON, M.; SANTANA, R.C. Populações, matrizes e idade da planta na expressão de variáveis físicas em frutos do pequi. **Rev Bras Frutic**, n. 34, p. 806-813, 2012. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbf/a/RHhz5dLmFmGHDS5SfsYLWkF/abstract/?lang=pt>>. Acesso em 05 jan 2024.

SILVA, G. P.; SOUZA, R. S. Os circuitos curtos de comercialização e consumo de Santiago (RS). **Open Science Research III**, v. 3, 2022. Disponível em: <<https://downloads.editoracientifica.com.br/articles/220308230.pdf>>. Acesso em: 04 jan. 2024.

SILVA, J. B.; FILHO, J. T.C. Influência de Métodos de Superação de Dormência e do Armazenamento na Germinação de Sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae). In: SHINYA, T. Y.; VILARINHO, M. P. **Livro de Resumos 37º Reunião Nordestina de Botânica**. Campo maior, 2021.

SILVA, M. D. **Cadeia produtiva de pequi no Estado de Goiás: análise do ambiente organizacional e institucional**. Planaltina: Universidade de Brasília, 2011.

SILVA, M. D. S. F. D; ANUNCIACÃO, V. S. D. Estratégias de educação ambiental para a gestão participativa: experiências em Unidades de Conservação, Brasil. **Geo UERJ**, n. 43, 2023. Disponível em: < <https://www.e-publicacoes.uerj.br/geouerj/article/view/42443>>. Acesso em 20 jan. 2024.

SILVA, M. N. S. D. Territorialidades do Pequi: Montes Claros e o Norte de Minas em questão. In: Encontro Nacional de Geografia Agrária. **Anais eletrônicos**. São Paulo, p.19, 2009. Disponível em: <http://www.geografia.fflch.usp.br/inferior/laboratorios/agraria/Anais%20XIXENGA/artigos/Silva_MNS>. Acesso em: 04 jan. 2024.

SILVÉRIO, D. V.; LENZA, E. Fenologia de espécies lenhosas em um cerrado típico no Parque Municipal do Bacaba, Nova Xavantina, Mato Grosso, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 10, p. 205-216, 2010.

SOARES, B. C. *et al.* Repeatability of physical and chemical characteristics in pequi fruits. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 2, p. 1-12, 2017.

SOUSA, J. V. P. D. *et al.* Uso de fungos entomopatogênicos utilizados para controle biológico de insetos-pragas na agricultura. **Facit Business and Technology Journal**, v. 2, n. 46, 2023. Disponível em: <<http://revistas.faculdefacit.edu.br/index.php/JNT/article/view/2503>>. Acesso em 20 jan. 2024.

SOUZA, O. A.; NASCIMENTO, J. L.; NAVES, R. V.; BORGES, J. D. Propagação sexuada de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.): efeito da procedência de frutos e do ácido giberélico na emergência de plântulas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 3, p. 131-136, 2007.

SOUZA, R. L. *et al.* Avaliação da Atividade Fungitóxica do Óleo de Copaíba (*Copaifera* spp.) da Amazônia Ocidental contra a Antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.) em Mamoeiros (*Carica papaya* L.). **Research, Society and Development**, v. 12, n. 12, p. e92121243960-e92121243960, 2023.

TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2013.

TOWNSEND, C. R. *et al.* Fundamentos em ecologia. **Artmed**, ed.3, 2010.

TRAVESET, A.; VERDÚ, M. A meta-analysis of the effect of gut treatment on seed germination. In: LEVELY, D.J.; GALETTI, M. (Eds.) Seed dispersal and frugivory: ecology, evolution and conservation: CABI, Wallingford. p. 339-350, 2002.

TRINDADE, R.; SILVA, J. K.; SETZER, W. N. *Copaifera* of the Neotropics: A Review of the Phytochemistry and Pharmacology. **International Journal of Molecular Science**, v. 19, n. 5, p. 1-33, 2018. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5983702/>>. Acesso em 21 dez. 2023.

TURCHETTO, C. *et al.* **Marcadores genéticos baseados em DNA. Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações**, p. 12-20, 2017.

VAN SCHAIK, C. P.; TERBORGH, J. W.; WRIGHT, J. The phenology of tropical forests: adaptative significance and consequence of consumers. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 24, n. 1, p. 353-377, 1993.

VASQUES, A. G. E. B. C.; COSTA, M. K.; LEITE, A. V. A importância da polinização biótica em cultivos agrícolas no Brasil. **Diversitas Journal**, v. 8, n. 1, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.48017/dj.v8i1.2342>>. Acesso em 28 dez. 2023.

VILELA, G. F.; CARVALHO, D.; VIEIRA, F. A. Fenologia de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) no alto Rio Grande, sul de Minas Gerais. **Revista Cerne**, v. 14, n. 4, p. 317-329, 2008.

WIERDL, M.; DOMINSKA, M.; PETES, T. D.; CAROLINA, N.; HILL, C. Instability in Yeast: Dependence on the Length of the microsatellite. **Genetics Society of America Genetics**, v. 146, n. 3, p. 769-779, 1997.

XAVIER, J. H. V. *et al.* Adaptação e utilização de dispositivo metodológico participativo visando o desenvolvimento sustentável de assentamentos de reforma agrária. *In*: Congresso Brasileiro de Sistemas de produção, p. 1-14, 2007.

YANG, Q. *et al.* Differentiation between populations of Japanese grenadier anchovy (*Coilia nasus*) in Northwestern Pacific based on ISSR markers: Implications for biogeography. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, p. 286-296, 2011.

ZECHINI, A. A. *et al.* Genetic conservation of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) through traditional land use. **Economic Botany**, v. 72, p. 1-14, 2018.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, n. 2, p. 176-183, 1994.

5. ARTIGO

5.1 Artigo – Diversidade genética em copaibeiras e pequizeiros por meio de oligonucleotídeos ISSR.

Este artigo foi elaborado conforme normas da revista **Genetics and Molecular Research**.

Diversidade genética em copaibeiras e pequizeiros por meio de oligonucleotídeos ISSR

Diversidade de coleções de copaíba e pequi com base em fragmentos ISSR

P.V.S. Silva^{1*}, A.C.A. Silveira¹, J.J.M. Alves³, F.E.R. Batista¹, M.F.L. Lacerda² e D.A. Sanglard¹

¹Laboratório de Biotecnologia, Centro de Pesquisas em Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

²Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Nova Porteirinha, Minas Gerais, Brasil.

³Empresa Rural Consultoria – Projetos Agropecuários e Crédito, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

*Both authors contributed equally to this article

Autor correspondente: P.V.S. Silva.

E-mail: pedrovitorsilvabio@gmail.com

RESUMO. A copaibeira (*Copaifera langsdorffii* Desf.) e o pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) são espécies importantes da flora brasileira, desempenhando funções relevantes em ecossistemas tropicais. Estudos de diversidade genética apoiam a elaboração de estratégias eficazes de conservação, manejo sustentável e compreensão de dinâmicas populacionais, assegurando a preservação destes recursos. O presente estudo teve como objetivo estimar a diversidade genética entre acessos de copaibeira e pequizeiro em municípios situados na mesorregião Norte e Noroeste do estado de Minas Gerais, Brasil por meio de oligonucleotídeos ISSR (Inter Simple Sequences Repeats). Foram obtidos 20 acessos de copaibeiras e 40 acessos de pequizeiros. Utilizou-se um protocolo adaptado do método CTAB. Foram submetidos 16 oligonucleotídeos a testes de gradiente na copaíba, dos quais 11 evidenciaram polimorfismos entre os acessos em condições específicas de anelamento. No caso do pequizeiro, dentre os 100 oligonucleotídeos testados, apenas quatro manifestaram polimorfismo, inviabilizando a construção de matrizes binárias viáveis para a estimação das dissimilaridades. As amplificações da copaibeira produziu 105 fragmentos utilizados na geração da matriz de dissimilaridade, revelando uma variabilidade geral entre os 20 acessos (de 19,04% a 75,38%). A estimativa do poder discriminatório do loco em H_{Oligo} foi de 0,2837, enquanto o do PIC_{Oligo} foi de 0,2279. Quando analisadas as dissimilaridades entre pares de acessos, 97 deles apresentaram valores superiores a 50%. O Coeficiente de Correlação Cofenética (CCC) foi elevado, atingindo 0,8275 nos procedimentos de obtenção do dendrograma (estresse de 11,92%). As aplicações dos métodos de agrupamentos ‘Hierárquico’ e ‘Otimização de Tocher’ resultaram na separação em três grupos, distinguindo os acessos 1, 14 e reunião dos demais. Os resultados dos testes dos pequizeiros sugerem a necessidade da utilização de outros marcadores para construção da dissimilaridade. Enquanto aos resultados das copaibeiras, apresentam potencial para subsidiar a elaboração de estratégias de conservação.

Palavras-chave: Dissimilaridade Genética; Bioma Cerrado; Conservação; Estrutura Populacional; Marcadores Moleculares.

INTRODUÇÃO

A copaibeira (*Copaifera langsdorffii* Desf.), conhecida popularmente como copaíba, configura-se como uma relevante espécie arbórea da família Fabaceae. Apresenta um padrão de crescimento lento, ultrapassando raramente a marca de 2 metros nos primeiros dois anos de desenvolvimento (Lorenzi, 2008). Entretanto, demonstra a capacidade de atingir alturas entre 25 a 35 metros, de ampla distribuição no Brasil, principalmente no Cerrado e Amazônia (Silva; Filho, 2021). O principal produto de interesse derivado da copaíba é o óleo, cujas propriedades fitoquímicas conferem-lhe uma ampla aplicação, notadamente nas áreas de nutrição humana, cosméticos e fármacos; destinados tanto ao uso humano quanto veterinário (Trindade; Silva; Setzer, 2018). A presença da copaíba exerce significativa importância para as micro, meso e macrofaunas, contribuindo para o equilíbrio ecológico, por meio de seus benefícios diretos e indiretos na promoção da biodiversidade e na manutenção dos ecossistemas (Coelho *et al.*, 2020; Derengoski *et al.*, 2022).

O pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) é uma espécie arbórea semidecídua, heliófita e xerófita seletiva, crescendo como árvore frondosa com variações em resposta ao ambiente, distribuindo-se pelo bioma Cerrado (Lisboa *et al.*, 2020). Os frutos possuem elevada importância em aspectos socioeconômicos, com destaque para culinárias regionais, extração de óleo e xaropes medicinais (Ataide *et al.*, 2019). Sua comercialização subsidia fontes de renda extras, contribuindo para economias regionais, o que traz benefícios para agricultores familiares e comunidades tradicionais durante a safra do pequi (Silva, 2009). A comercialização pode ocorrer de forma direta, em feiras e mercados locais, ou indireta, por meio de intermediários e cooperativas especializadas em produtos regionais.

As atividades extrativistas configuram-se como uma alternativa econômica ao desmatamento e à monocultura, baseando-se em práticas que visam a utilização dos produtos sem comprometer a integridade dos ecossistemas. Essa abordagem enfatiza a obtenção de recursos de forma equilibrada, respeitando os limites de regeneração da biodiversidade local (Silva, 2011; Oliveira *et al.*, 2017). Além disso, incentiva a preservação do cerrado ao viabilizar práticas que valorizam a conservação, garantindo a preservação a longo prazo dos recursos, mediante a promoção da manutenção da biodiversidade e a minimização dos impactos ambientais (Silva; Souza, 2022; Ferreira; Bartachevits, 2022).

No contexto da copaibeira, a prática extrativista está intrinsecamente vinculada à obtenção de óleo com finalidades industriais e à exploração madeireira, destacando-se como as principais atividades associadas a essa espécie. A sua madeira possui propriedades de notável resistência à umidade e ataques de insetos xilófagos, tornando-se particularmente atrativa para o mercado (Pieri *et al.*, 2009). Com isso, o pequizeiro e a copaibeira encontram-se suscetíveis a ameaças decorrentes de limitações técnicas de manejo, as quais dependem do entendimento dos efeitos da erosão genética, bem como dos mecanismos vegetativos e reprodutivos, como discutido por Silva *et al.* (2012). Dessa forma, uma abordagem equilibrada para instituir tal exploração deve estar fundamentada no entendimento da dispersão filogeográfica, destacando o estudo da diversidade genética. Tais conhecimentos revelam-se essenciais para subsidiar programas de conservação de recursos genéticos e práticas de manejo florestal (Vilela *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2020).

Os padrões de variabilidade genética observados entre os acessos de copaibeira e pequizeiro possibilitam aprimorar a seleção, conservação e aplicação de técnicas de manejo condizentes com as particularidades dessas espécies de ocorrência natural, sendo efetuada através da análise sistemática de marcadores genéticos selecionados, coleta de dados genômicos, interpretação abrangente dos resultados e subsequente desenvolvimento de abordagens estratégicas congruentes com os objetivos predefinidos (Gomes *et al.*, 2022). Autores de estudos que norteiam a análise de diversidade genética de espécies vegetais e animais, muitas vezes optaram por oligonucleotídeos ISSR (Inter Simple Sequences Repeats) para suas pesquisas, pois são reprodutíveis em diferentes laboratórios e produzem bandas mais confiáveis e reprodutíveis

quando comparado a outro marcador dominante, como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), devido à temperatura de anelamento e acesso a um maior número de sequências (Yang *et al.*, 2011; Ng; Tan, 2015).

Sendo assim, a utilização de oligonucleotídeos ISSR em estudos de diversidade genética é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes de conservação. A técnica possibilita a avaliação intrapopulacional da diversidade genética, permitindo identificar padrões, como a distribuição geográfica dessa variabilidade (Charlesworth, 2009). A análise contribui significativamente para a compreensão da estrutura populacional, facilitando a identificação de áreas com diferentes níveis de diversidade genética e, conseqüentemente, a priorização de locais para ações de conservação e restauração, aumentando as perspectivas de reintrodução bem-sucedida. Com base nessas informações, os gestores de conservação podem implementar estratégias de manejo adaptativo, abordando desafios como mudanças climáticas, pragas ou doenças, e realizar o monitoramento contínuo das populações ao longo do tempo, prevenindo potenciais efeitos de gargalo genético (Caballero *et al.*, 2010; Felix *et al.*, 2020; Morillo *et al.*, 2022; Pimenta *et al.*, 2022). Diante disso, o presente estudo objetivou realizar uma análise da diversidade genética entre acessos pertencentes a uma coleção de copaibeira e outra de pequiheiro, mediante a utilização de oligonucleotídeos ISSR.

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético e estratégias de avaliação

Para a constituição de duas coleções que abrangem acessos de copaibeira e pequiheiro, procedeu-se à coleta de folhas em diversos municípios localizados na mesorregião Norte e Noroeste do estado de Minas Gerais, Brasil. Os acessos de copaibeiras foram adquiridos em Montes Claros-MG e Mirabela-MG, totalizando 20 acessos. Por sua vez, os acessos de pequiheiro foram coletados em Bocaiuva-MG, Bonfinópolis-MG, Dom Bosco-MG e Salinas-MG, totalizando 40 acessos. Posteriormente, foram conduzidos procedimentos moleculares e biométricos para estimar a diversidade genética. Todos os procedimentos foram conduzidos nas instalações do Laboratório de Biotecnologia, situado no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, *Campus* Regional Montes Claros.

Análises moleculares

Os acessos coletados foram previamente armazenados em um ultrafreezer a -80°C para conservação dos materiais vegetais. As extrações de DNA seguiram os procedimentos preconizados por Doyle e Doyle (1990), com algumas adaptações propostas neste trabalho. As modificações incorporadas no protocolo incluíram a introdução do agente PVP (polivinilpirrolidona), cujo propósito é a remoção de polifenóis e a prevenção da oxidação dos metabólitos secundários presentes no tecido vegetal (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Adicionalmente, foi implementada uma etapa suplementar de extração utilizando clorofórmio-álcool isoamílico, favorecendo a remoção de proteínas e lipídios, promovendo a purificação do DNA, e a inclusão do tratamento com RNase após a etapa de extração com clorofórmio e antes da precipitação do DNA com isopropanol gelado (Agwanda *et al.*, 1997). Uma adaptação adicional consistiu na eliminação do reagente fenol, devido à sua conhecida toxicidade. Além disso, o procedimento de armazenamento das amostras a 4°C foi substituído pela incubação em freezer a -20°C .

Inicialmente, o banho-maria (Equipamento da marca LimaTec, modelo NOVUS N1030) foi ajustado a 65°C . Em seguida, as amostras foram maceradas com pilão e nitrogênio líquido até que o tecido estivesse completamente pulverizado. O tecido recém-macerado no crisol (cadinho) foi transferido para os microtubos, nos quais 800 μL de tampão de extração foram adicionados [CTAB 2% (m/v); Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM pH 8,0; NaCl 1,4 M; PVP 40= 1%],

sob condições que incluíram a adição de β -mercaptoetanol ao tampão (40 μ L de β -mercaptoetanol para 20 mL de tampão).

Os microtubos foram incubados em banho-maria por 1 hora, fazendo-se agitações a cada 10 min. Posteriormente, estes foram retirados e deixados em temperatura de 25°C por 30 min para resfriamento. Em seguida, procedeu-se à primeira extração com solvente orgânico (600 μ L de Clorofórmio: Álcool isoamílico, na proporção de 24:1, respectivamente), na qual os tubos foram agitados por 5 minutos para formar uma emulsão homogênea. Os microtubos foram então submetidos a uma centrifuga por 10 min em 10.464,48 força g, (Equipamento da marca Solab, modelo SL-706).

Após a centrifugação, o sobrenadante foi pipetado para novos microtubos. Estes últimos foram incubados em banho-maria a 37°C por 30 min, aos quais foram adicionados 10 μ L de RNase a 10mg/mL. Em seguida, foram adicionados 60 μ L da solução CTAB 10% [1,4M NaCl] à fase aquosa, sendo agitadas por 5 min até homogeneização da solução. Subsequentemente, um novo passo de desproteinização foi reiterado, incorporando-se 600 μ L de clorofórmio e álcool isoamílico no microtubo, seguida de centrifugação por um período de 10 min em 10.464,48 força g, a uma temperatura de 4°C. A fase aquosa superior foi retirada e transferida para um novo microtubo, ao qual foram adicionados 450 μ L de isopropanol gelado. Os microtubos foram então submetidos ao refrigerador a 5°C por 12 h.

Após a precipitação do DNA, os tubos foram submetidos a uma nova centrifugação por 10 min em 14.243,32 força g, a 4°C. Em seguida, 200 μ L de etanol 70% foram adicionados aos pellets, que foram deixados por 10 minutos em 37°C. Posteriormente, ocorreu uma segunda centrifugação em 14.243,32 força g, por 10 minutos a 4°C. Em seguida, os pellets foram expostos à secagem em capela de fluxo laminar por aproximadamente 30 min. Após a completa secagem, adicionou-se 50 μ L de água ultrapura para a solubilização do DNA e a subsequente quantificação.

As concentrações de DNA das amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Equipamento da marca TECAN, modelo Infinite M Plex), através da leitura da absorbância a 260 nm, onde cada unidade de absorbância correspondeu à concentração de 50 ng/mL de DNA de fita dupla (Sambrook *et al.*, 1989).

As amplificações via PCR foram realizadas utilizando uma coleção de oligonucleotídeos ISSR, desenvolvida pela University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada). De maneira prévia, executou-se testes de gradientes de temperaturas de anelamento, por meio de termocicladores com este recurso (Equipamentos da marca Eppendorf, modelo Gradient). As máquinas foram configuradas para o espectro de 45°C a 65°C, sendo utilizados os DNAs de 02 (dois) indivíduos aleatórios da população. Neste contexto, foram escolhidas as temperaturas de anelamentos específicas para cada oligonucleotídeo, tal que proporcionassem a otimização de padrões eletroforéticos com maiores quantidades de polimorfismos. Cada reação continha 25 μ L de mistura (12,4 μ L de H₂O ultrapura; 3,5 μ L de MgCl₂ 2,8 mM; 2,5 μ L de Tris / KCl pH 8,3 10 mM / 50 mM; 1,0 μ L de dNTP; 2,5 μ L de oligonucleotídeo ISSR 0,4 μ M; 0,1 μ L de *Taq* polimerase 1,0 un/ μ L e; 3,0 μ L de DNA 10 ng/ μ L). As programações previam uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 5 min; seguida por 35 ciclos de [desnaturação (94°C / 1 min), anelamento (46°C a 59°C / 1 min) e extensão (72°C / 2 min) e; uma fase de extensão final de 72°C por 7 min. Logo após essas ciclagens, o aparelho conservou as reações a 4°C, até o acondicionamento em freezer a -20 °C.

Os produtos resultantes das amplificações foram separados por eletroforese horizontal em géis de agarose 1,2% (m/v) e imersos em tampão SB (8g de NaOH 0,2 mM, 45g H₂BO₃ 0,73 mM e 1 L H₂O 1,0 mM destilada), seguindo procedimentos adaptados de (Brody; Kern, 2004). No momento da aplicação, foram adicionados, à cada amostra, 3 μ L do corante tipo IV [0,125% (m/v) de azul-de-bromofenol e 10% (m/v) de sacarose] e 5 μ L de GelRed™. Os géis foram submetidos a uma carga de 120 V, por 3 h. Subsequentemente, realizou-se a integração de imagens dos produtos eletroforéticos por meio de um sistema de fotodocumentação (Equipamento da marca Locus Biotecnologia, modelo L-PIX).

Análises biométricas baseadas nos dados moleculares

Os dados foram analisados por meio de matrizes de dados binários, considerando-se a presença (1) e a ausência (0) de fragmentos (bandas) aferidos dos géis fotodocumentados. O coeficiente de dissimilaridade adotado foi o complemento aritmético do índice de 'Nei e Li' (SNL) = $[2a / (2a + b + c)]$; em que "a" representa o número de coincidências do tipo (1)-(1) para cada par de acessos; "b" é o número de discordâncias do tipo (1)-(0); e "c" é o número de discordâncias do tipo (0)-(1).

Concomitantemente, procedeu-se à análise de agrupamento pelo Método 'Hierárquico' [Ligação Média Entre Grupos (UPGMA)] e Otimização de 'Tocher', com estruturação em dendrograma e dispersão gráfica, tendo como base a matriz de dissimilaridade gerada pelo índice 'Nei e Li' (Cruz *et al.*, 2013). O coeficiente de correlação cofenético (CCC) para avaliar o ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma gerado foi estimado conforme proposto por Sokal e Rohlf (1962).

Os locos foram estimados com base em H (Heterozygosity) e no PIC (Polymorphism Information Content), que é uma estimativa utilizada para a avaliação do poder discriminatório de um loco. A informatividade do loco p_i é a frequência do alelo p no loco p_i , calculado pela equação: $PIC = 1 - \sum p_i^2$; a informatividade do primer p_{ij} é a frequência do alelo p do loco i , no oligonucleotídeo j , sendo calculada por $PIC_{oligo} = 1 - \sum p_i^2 - \sum \sum p_i^2 p_j^2$ (Rezende *et al.*, 2009). Todas as análises foram executadas com o auxílio do programa computacional GENES (Cruz, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após as extrações dos DNA, procedeu-se os testes para averiguação das concentrações das amostras por espectrofotometria, visando a obtenção de amostras com 10ng/uL. Ferreira e Grattapaglia (1998) recomendam que a relação A_{260nm}/A_{280nm} esteja entre 1,2 a 2,0; intervalo este que englobou a maior parte das amostras obtidas (Tabela 1 e Tabela 2). As amostras de DNA alcançaram concentrações mínimas de 41,2 [DNA] (ng/UL), o que é 80% superior ao recomendado para ampliações com oligonucleotídeos ISSR (Tabela 1). Essa constatação é corroborada pelos resultados da Tabela 2, os quais, em sua maioria, também atenderam a esses parâmetros (Goldwin, *et al.*, 1997).

Tabela 1. Resultados da quantificação por espectrofotometria de DNA's de folhas de copaibeira.

Nº do acesso	A260nm	A280nm	A260nm/ A280nm	[DNA] (ng/uL)
1	0,1199	0,0712	1,68	119,9
2	0,1173	0,0874	1,34	117,3
3	0,1723	0,1211	1,42	172,3
4	0,1312	0,1068	1,23	131,2
5	0,1426	0,1170	1,22	142,6
6	0,1231	0,0873	1,33	123,1
7	0,1721	0,1406	1,22	172,1
8	0,3088	0,195	1,58	308,8
9	0,2027	0,1708	1,19	202,7
10	0,2233	0,1892	1,18	223,3
11	0,4120	0,0257	1,60	41,2
12	0,1757	0,1364	1,29	175,5
13	0,2179	0,1440	1,51	217,9
14	0,1757	0,1557	1,11	175,5
15	0,2556	0,1995	1,28	255,6
16	0,1601	0,1183	1,35	160,1
17	0,1957	0,0937	2,09	195,7
18	0,1607	0,0743	2,16	160,7
19	0,1443	0,0960	1,50	144,3
20	0,2678	0,1818	1,47	267,8

Tabela 2. Resultados da quantificação por espectrofotometria de DNA's de folhas de pequiizeiro.

Nº do acesso	A260 _{nm}	A280 _{nm}	A260 _{nm} / A280 _{nm}	[DNA] (ng/uL)
1	0,1358	0,140	1,31	135,8
2	0,0399	0,0432	0,92	39,9
3	0,0247	0,0218	1,13	24,7
4	0,0261	0,0157	1,66	26,1
5	0,2125	0,2153	0,99	212,5
6	0,0193	0,0166	1,16	19,3
7	0,079	0,0579	1,36	79,0
8	0,1059	0,0738	1,43	105,9
9	0,2249	0,2057	1,09	224,9
10	0,2246	0,1921	1,17	224,6
11	0,2928	0,2433	1,20	292,8
12	0,0927	0,0709	1,31	92,7
13	0,068	0,065	1,05	68,0
14	0,1443	0,4518	1,00	449,7
15	0,61	0,0528	1,16	61,0
16	0,0105	0,0738	1,43	10,5
17	0,0255	0,2154	1,19	25,5
18	0,0620	0,5132	1,21	62,0
19	0,0464	0,3805	1,22	46,4
20	0,0207	0,0142	1,46	20,7
21	0,0562	0,0393	1,43	56,2
22	0,0449	0,0451	1,00	44,9
23	0,2377	0,1829	1,30	237,7
24	0,0144	0,0128	1,12	14,4
25	0,068	0,0065	1,05	68,0
26	0,032	0,0164	1,95	32,0
27	0,0252	0,0127	1,98	25,2
28	0,0211	0,0109	1,94	21,1
29	0,0309	0,0155	1,99	30,9
30	0,058	0,0255	2,27	58,0
31	0,0157	0,0057	2,75	15,7
32	0,0421	0,0207	2,03	42,1
33	0,0276	0,0105	2,63	27,6
34	0,0602	0,0311	1,94	60,2
35	0,0487	0,0195	2,5	48,7
36	0,0375	0,0138	2,72	37,5
37	0,0186	0,0159	1,17	18,6
38	0,0197	0,0125	1,58	19,7
39	0,0186	0,0114	1,63	18,6
40	0,0132	0,0098	1,35	13,2

Foram conduzidos ensaios empregando gradientes de temperaturas de anelamento com o intuito de avaliar as capacidades de amplificação utilizando diferentes oligonucleotídeos ISSR disponíveis. Outros estudos também adotaram ensaios com gradientes de temperaturas de anelamento (Costa *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2018; Lopes *et al.*, 2020), como forma de evitar reações que não explorassem ao máximo os potenciais polimorfismos ou que apresentassem falhas completas. As temperaturas dos gradientes intercalaram entre 45°C e 65°C. Durante a realização das análises moleculares, 16 oligonucleotídeos ISSR foram submetidos a testes para a coleção de copaibeiras, enquanto 100 foram avaliados para o dos pequiizeiros (Tabelas 3 e 4).

Entre os 16 oligonucleotídeos testados para a copaibeira, 11 caracterizaram-se como polimórficos nas temperaturas de anelamento específicas identificadas. No caso do pequiizeiro, apenas quatro dos 100 oligonucleotídeos testados amplificaram, número este insuficiente para a obtenção de matriz estatisticamente significativa.

Tabela 3. Resultados dos testes de gradiente de temperaturas de anelamento, envolvendo DNA's de folhas da Copaibeira amplificados com oligonucleotídeos ISSR desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada).

Oligonucleotídeos ISSR (5' → 3')	Temperaturas de anelamento - Ta (°C)
UBC 890 (VHV GTG TGT GTG TGT GT)	54°C
UBC 876 (GAT AGA TAG ACA GAC A)	Não amplifica na espécie
UBC 886 (VDV CTC TCT CTC TCT CT)	54°C
UBC 842 (GAG AGA GAG AGA GAG AYG)	51°C
UBC 818 (CAC ACA CAC ACA CAC AG)	61°C
UBC 827 (ACA CAC ACA CAC ACA CG)	Monomórfico
UBC 855 (ACA CAC ACA CAC ACA CYT)	Não amplifica na espécie
UBC 884 (HBH AGA GAG AGA GAG AG)	Não amplifica na espécie
UBC 816 (CAC ACA CAC ACA CAC AT)	59°C
UBC 828 (TGT GTG TGT GTG TGT GA)	Não amplifica na espécie
UBC 810 (GAG AGA GAG AGA GAG AT)	56°C
UBC 847 (CAC ACA CAC ACA CAC ARC)	45°C
UBC 856 (ACA CAC ACA CAC ACA CYA)	59°C
UBC 888 (BDB CAC ACA CAC ACA CA)	63°C
UBC 889 (DBD ACA CAC ACA CAC AC)	56°C
UBC 812 (GAG AGA GAG AGA GAG AA)	54°C

N = (A, G, C, T); R = (A, G); Y = (C, T); B = (C, G, T) (I. e. not A); D = (A, G, T) (I. e. not C); H = (A, C, T) (I. e. not G); V = (A, C, G) (I. e. not T).

Tabela 4. Resultados dos testes de gradiente de temperaturas de anelamento, envolvendo DNA's de folhas do Pequizeiro amplificados com oligonucleotídeos ISSR desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada).

Oligonucleotídeos ISSR (5' → 3')	Temperaturas de anelamento - Ta (°C)
UBC 801 ATA TAT ATA TAT ATA TT	Não amplifica na espécie
UBC 802 ATA TAT ATA TAT ATA TG	Não amplifica na espécie
UBC 803 ATA TAT ATA TAT ATA TC	Não amplifica na espécie
UBC 804 TAT ATA TAT ATA TAT AA	Não amplifica na espécie
UBC 805 TAT ATA TAT ATA TAT AC	Não amplifica na espécie
UBC 806 TAT ATA TAT ATA TAT AG	61°C
UBC 807 AGA GAG AGA GAG AGA GT	Não amplifica na espécie
UBC 808 AGA GAG AGA GAG AGA GC	Não amplifica na espécie
UBC 809 AGA GAG AGA GAG AGA GG	Não amplifica na espécie
UBC 810 GAG AGA GAG AGA GAG AT	Não amplifica na espécie
UBC 811 GAG AGA GAG AGA GAG AC	Não amplifica na espécie
UBC 812 GAG AGA GAG AGA GAG AA	Não amplifica na espécie
UBC 813 CTC TCT CTC TCT CTC TT	Não amplifica na espécie
UBC 814 CTC TCT CTC TCT CTC TA	Não amplifica na espécie
UBC 815 CTC TCT CTC TCT CTC TG	Não amplifica na espécie
UBC 816 CAC ACA CAC ACA CAC AT	Não amplifica na espécie
UBC 817 CAC ACA CAC ACA CAC AA	Não amplifica na espécie
UBC 818 CAC ACA CAC ACA CAC AG	Não amplifica na espécie
UBC 819 GTG TGT GTG TGT GTG TA	Não amplifica na espécie
UBC 820 GTG TGT GTG TGT GTG TC	Não amplifica na espécie
UBC 821 GTG TGT GTG TGT GTG TT	Não amplifica na espécie
UBC 822 TCT CTC TCT CTC TCT CA	Não amplifica na espécie
UBC 823 TCT CTC TCT CTC TCT CC	Não amplifica na espécie
UBC 824 TCT CTC TCT CTC TCT CG	Não amplifica na espécie
UBC 825 ACA CAC ACA CAC ACA CT	Não amplifica na espécie
UBC 826 ACA CAC ACA CAC ACA CC	Não amplifica na espécie
UBC 827 ACA CAC ACA CAC ACA CG	Não amplifica na espécie
UBC 828 TGT GTG TGT GTG TGT GA	Não amplifica na espécie

Tabela 4. Continuação.

UBC 829 TGT GTG TGT GTG TGT GC	Não amplifica na espécie
UBC 830 TGT GTG TGT GTG TGT GG	Não amplifica na espécie
UBC 831 ATA TAT ATA TAT ATA TYA	54°C
UBC 832 ATA TAT ATA TAT ATA TYC	Não amplifica na espécie
UBC 833 ATA TAT ATA TAT ATA TYG	54°C
UBC 834 AGA GAG AGA GAG AGA GYT	Não amplifica na espécie
UBC 835 AGA GAG AGA GAG AGA GYC	Não amplifica na espécie
UBC 836 AGA GAG AGA GAG AGA GYA	Não amplifica na espécie
UBC 837 TAT ATA TAT ATA TAT ART	Não amplifica na espécie
UBC 838 TAT ATA TAT ATA TAT ARC	Não amplifica na espécie
UBC 839 TAT ATA TAT ATA TAT ARG	Monomórfico
UBC 840 GAG AGA GAG AGA GAG AYT	Não amplifica na espécie
UBC 841 GAG AGA GAG AGA GAG AYC	Não amplifica na espécie
UBC 842 GAG AGA GAG AGA GAG AYG	Não amplifica na espécie
UBC 843 CTC TCT CTC TCT CTC TRA	Não amplifica na espécie
UBC 844 CTC TCT CTC TCT CTC TRC	Não amplifica na espécie
UBC 845 CTC TCT CTC TCT CTC TRG	Não amplifica na espécie
UBC 846 CAC ACA CAC ACA CAC ART	Não amplifica na espécie
UBC 847 CAC ACA CAC ACA CAC ARC	Não amplifica na espécie
UBC 848 CAC ACA CAC ACA CAC ARG	Não amplifica na espécie
UBC 849 GTG TGT GTG TGT GTG TYA	Não amplifica na espécie
UBC 850 GTG TGT GTG TGT GTG TYC	Não amplifica na espécie
UBC 851 GTG TGT GTG TGT GTG TYG	Não amplifica na espécie
UBC 852 TCT CTC TCT CTC TCT CRA	Não amplifica na espécie
UBC 853 TCT CTC TCT CTC TCT CRT	Não amplifica na espécie
UBC 854 TCT CTC TCT CTC TCT CRG	Não amplifica na espécie
UBC 855 ACA CAC ACA CAC ACA CYT	Não amplifica na espécie
UBC 856 ACA CAC ACA CAC ACA CYA	Não amplifica na espécie
UBC 857 ACA CAC ACA CAC ACA CYG	Não amplifica na espécie
UBC 858 TGT GTG TGT GTG TGT GRT	Não amplifica na espécie
UBC 859 TGT GTG TGT GTG TGT GRC	Não amplifica na espécie
UBC 860 TGT GTG TGT GTG TGT GRA	Não amplifica na espécie
UBC 861 ACC ACC ACC ACC ACC ACC	Não amplifica na espécie
UBC 862 AGC AGC AGC AGC AGC AGC	Monomórfico
UBC 863 AGT AGT AGT AGT AGT AGT	Não amplifica na espécie
UBC 864 ATG ATG ATG ATG ATG ATG	Não amplifica na espécie
UBC 865 CCG CCG CCG CCG CCG CCG	Não amplifica na espécie
UBC 866 CTC CTC CTC CTC CTC CTC	Não amplifica na espécie
UBC 867 GGC GGC GGC GGC GGC GGC	65°C
UBC 868 GAA GAA GAA GAA GAA GAA	Não amplifica na espécie
UBC 869 GTT GTT GTT GTT GTT GTT	Não amplifica na espécie
UBC 870 TGC TGC TGC TGC TGC TGC	Não amplifica na espécie
UBC 871 TAT TAT TAT TAT TAT TAT	Não amplifica na espécie
UBC 872 GAT AGA TAG ATA GAT A	Não amplifica na espécie
UBC 873 GAC AGA CAG ACA GAC A	Não amplifica na espécie
UBC 874 CCC TCC CTC CCT CCC T	Não amplifica na espécie
UBC 875 CTA GCT AGC TAG CTA G	Monomórfico
UBC 876 GAT AGA TAG ACA GAC A	Não amplifica na espécie
UBC 877 TGC ATG CAT GCA TGC A	Monomórfico
UBC 878 GGA TGG ATG GAT GGA T	Não amplifica na espécie
UBC 879 CTT CAC TTC ACT TCA	Não amplifica na espécie
UBC 880 GGA GAG GAG AGG AGA	Não amplifica na espécie

Tabela 4. Continuação.

UBC 881 GGG TGG GGT GGG GTG	Não amplifica na espécie
UBC 882 VBV ATA TAT ATA TAT AT	Não amplifica na espécie
UBC 883 BVB TAT ATA TAT ATA TA	Não amplifica na espécie
UBC 884 HBH AGA GAG AGA GAG AG	Não amplifica na espécie
UBC 885 BHB GAG AGA GAG AGA GA	Não amplifica na espécie
UBC 886 VDV CTC TCT CTC TCT CT	Não amplifica na espécie
UBC 887 DVD TCT CTC TCT CTC TC	Não amplifica na espécie
UBC 888 BDB CAC ACA CAC ACA CA	Não amplifica na espécie
UBC 889 DBD ACA CAC ACA CAC AC	Não amplifica na espécie
UBC 890 VHV GTG TGT GTG TGT GT	Não amplifica na espécie
UBC 891 HVH TGT GTG TGT GTG TG	Não amplifica na espécie
UBC 892 TAG ATC TGA TAT CTG AAT TCC C	Não amplifica na espécie
UBC 893 NNN NNN NNN NNN NNN	Não amplifica na espécie
UBC 894 TGG TAG CTC TTG ATC ANN NNN	Monomórfico
UBC 895 AGA GTT GGT AGC TCT TGA TC	Monomórfico
UBC 896 AGG TCG CGG CCG CNN NNN NAT G	Não amplifica na espécie
UBC 897 CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G	Monomórfico
UBC 898 GAT CAA GCT TNN NNN NAT GTG G	Não amplifica na espécie
UBC 899 CAT GGT GTT GGT CAT TGT TCC A	Não amplifica na espécie
UBC 900 ACT TCC CCA CAG GTT AAC ACA	Não amplifica na espécie

N = (A, G, C, T); R = (A, G); Y = (C, T); B = (C, G, T) (I. e. not A); D = (A, G, T) (I. e. not C); H = (A, C, T) (I. e. not G); V = (A, C, G) (I. e. not T).

A seleção de oligonucleotídeos funcionais é um pré-requisito para se obter as estimativas de diversidade genética de uma espécie (Chagas *et al.*, 2015). Um dos critérios preponderantes na seleção dos oligonucleotídeos ISSR reside na sua capacidade de amplificação em diversas espécies, conforme destacado por Domingues *et al.* (2017), uma vez que tais oligonucleotídeos dispensam a necessidade prévia de conhecimento genômico. A ausência de amplificação efetiva em determinados loci do pequiheiro pode ser atribuída a fatores específicos relacionados à sua composição genética ou à presença de regiões que não são adequadamente amplificadas pelos oligonucleotídeos ISSR utilizados no presente estudo (Turchetto-Zolet *et al.*, 2017).

Existem diversos fatores que podem influenciar a qualidade das bandas amplificadas, como as características da própria espécie (Amaral *et al.*, 2019). Nesse sentido, segundo Caixeta *et al.* (2016), a variação na frequência das bandas amplificadas pode ser influenciada também pela presença e abundância das sequências complementares dos oligonucleotídeos utilizados, cuja abundância de repetições pode variar entre as espécies. Sendo assim, a ausência da amplificação dos 96 oligonucleotídeos ISSR no pequiheiro pode ser relacionada com a ausência ou baixa frequência das repetições complementares no genoma da espécie.

O pequiheiro e a copaíba apresentam diferentes modos de reprodução que podem influenciar a estrutura genética das populações. O pequiheiro é predominantemente alógamo, dependendo da polinização cruzada para a produção de sementes, enquanto a copaíba pode adotar tanto a polinização cruzada quanto a autopolinização (Carvalho, 2009; Kuhlmann, 2018; Vasques; Costa; Leite, 2023). A análise comparativa dos resultados ISSR em populações de pequiheiro e copaíba pode revelar padrões distintos de variabilidade genética associados aos diferentes modos de reprodução (Amaral *et al.*, 2019; Hadeithi; Jasim, 2021).

Na copaibeira, os 11 oligonucleotídeos selecionados nos testes de gradiente de temperatura foram empregados na análise da diversidade genética. As reações realizadas com esses oligonucleotídeos resultaram em 105 fragmentos amplificados, os quais atingiram uma taxa de 99,04% de polimorfismo (Tabela 5). Ao observar a tabela, nota-se que o número de fragmentos gerados variou de 06 (UBC 847) a 13 (UBC 889). Apesar de UBC 889 ter produzido o maior número de fragmentos, seu PIC_{oligo} foi relativamente baixo. De maneira geral, os valores de PIC_{oligo} obtidos neste estudo são inferiores aos observados para H_{oligo} sugerindo que o marcador ISSR

utilizado tem uma boa capacidade de discriminar entre indivíduos ou populações, pois são medidas usadas para avaliar a diversidade genética em populações. O PIC_{oligo} se baseia apenas nos loci polimórficos, enquanto o H_{oligo} considera todos os loci, tanto os polimórficos quanto os monomórficos (Jiao *et al.*, 2010). A média de fragmentos polimórficos por oligonucleotídeo foi de 9,4545, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados dos testes de gradiente de temperaturas de anelamento, envolvendo DNA's de folhas de Copaibeira amplificadas com oligonucleotídeos ISSR desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada).

Oligonucleotídeos	Total de Fragmentos	Fragmentos monomórficos	Fragmentos polimórficos	H_{oligo}	PIC_{oligo}
UBC 810	10	1	9	0,3048	0,2468
UBC 812	10	0	10	0,1754	0,1520
UBC 816	8	0	8	0,1985	0,1638
UBC 818	9	0	9	0,2930	0,2423
UBC 842	12	0	12	0,3094	0,2492
UBC 847	6	0	6	0,3894	0,3017
UBC 856	9	0	9	0,3629	0,2894
UBC 886	10	0	10	0,2520	0,2106
UBC 888	7	0	7	0,3237	0,2317
UBC 889	13	0	13	0,2253	0,1854
UBC 890	11	0	11	0,2865	0,2347
Médias	9,5454	0,0909	9,4545	0,2837	0,2279

* H_{oligo} e PIC_{oligo} correspondem a valores médios dos fragmentos obtidos para cada oligonucleotídeo.

Estudos recentes que utilizaram os mesmos marcadores moleculares desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada) (Maltezo; Medeiros e Rossi, 2021), também obtiveram elevados percentuais de polimorfismos (99,80%), comparando o valor encontrado neste estudo, no qual 99,04% dos fragmentos foram polimórficos, sugerindo a ampla variabilidade genética dentro das populações estudadas em ambos os estudos.

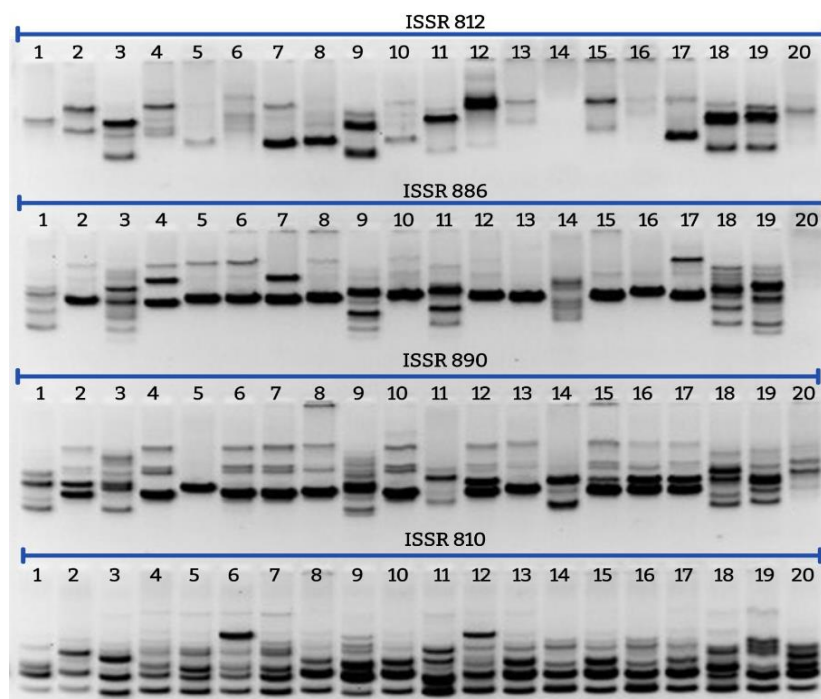


Figura 1. Amplificação dos genomas de 20 acessos (folhas) de copaibeira. As sequências ordinal superior e inferior referem-se aos oligonucleotídeos ISSR 812, ISSR 886, ISSR 890 (Ta: 54°C) e ISSR 810 (Ta: 56°C), respectivamente. Cada uma das amostras continha 25 uL de mix-PCR, 5 uL de GelRed™ e 3 uL de corante tipo IV, submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v), durante 3 h.

Com base nos resultados obtidos por meio das ampliações via PCR, procedeu-se à geração da matriz de distâncias genéticas utilizando o coeficiente de dissimilaridade do índice de ‘Nei e Li’. Em contraste, este índice possui a vantagem de não considerar como coincidências, as ocorrências do tipo (0)-(0), as quais, por sua vez, não indicam necessariamente alelos recessivos idênticos, pois, é comum que os genótipos de diferentes indivíduos ou populações compartilhem o mesmo alelo em um determinado locus, ou seja, apresentem o mesmo valor (0). No entanto, o fato de dois genótipos compartilharem o mesmo alelo em um locus não significa necessariamente que eles sejam geneticamente semelhantes em outros aspectos. Este índice atribui um peso duplicado aos valores de coincidências do tipo (1)-(1) para cada par de acessos, conforme proposto por Mir *et al.* (2021).

Na matriz de dissimilaridade, obtida através do complemento aritmético do índice de ‘Nei e Li’ (Tabela 6), destaca-se a presença de valores elevados de dissimilaridade entre os 20 acessos de copaibeira. Ao analisar as disparidades entre pares de acessos, 97 deles apresentaram dissimilaridades superiores a 50%. A divergência genética observada neste estudo assemelha-se a pesquisas sobre diversidade genética relacionadas à copaíba (Maltezo; Medeiros e Rossi, 2021).

Tabela 6. Matriz de dissimilaridade (%) (complemento aritmético do índice de ‘Nei e Li’ entre 20 acessos de copaibeira, estimadas a partir de 105 fragmentos (locos), a partir de 11 oligonucleotídeos ISSR desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada), representadas em cinza as variações mais divergentes entre si (menos similares).

Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	0																			
2	64	0																		
3	52	47	0																	
4	75	37	57	0																
5	67	56	54	40	0															
6	70	46	67	26	46	0														
7	73	39	65	26	40	25	0													
8	67	32	53	48	52	42	36	0												
9	50	54	29	59	65	62	57	50	0											
10	68	43	49	46	57	46	46	28	49	0										
11	53	59	55	60	64	58	61	47	45	41	0									
12	61	51	49	51	62	59	59	55	42	48	49	0								
13	65	39	54	42	49	47	39	42	47	41	47	46	0							
14	65	63	63	67	58	72	65	55	60	67	58	75	58	0						
15	73	40	47	38	49	52	45	45	47	39	52	40	19	57	0					
16	63	47	41	53	50	53	50	38	50	37	50	42	35	61	31	0				
17	75	45	50	48	52	50	45	38	48	40	53	40	28	65	24	29	0			
18	45	60	51	58	56	58	56	56	44	48	55	28	52	51	59	55	51	51	0	
19	53	45	43	45	47	48	40	46	48	45	35	45	43	58	43	41	41	24	0	
20	68	57	52	46	44	52	39	53	66	48	58	51	55	67	46	44	44	50	33	0

Através da análise de agrupamento obteve-se o dendrograma (Figura 2), utilizando o critério de separação em grupos proposta por Mojena (1977), o qual se fundamenta na avaliação do tamanho relativo dos níveis de fusões (distâncias) no dendrograma. Este critério ocorre quando a média dos níveis de fusão (distâncias) são maiores do que o ponto de corte [Ponto de corte = média + (K x DP)]. Obteve dois cortes nas distâncias de 0,6312 e 0,6386, de modo a formarem três grupos de acessos (Tabela 7). A determinação do número de agrupamentos nos métodos hierárquicos pode ser abordada mediante diversos critérios, incluindo considerações práticas do pesquisador, análise visual das ramificações presentes no dendrograma, identificação de pontos onde ocorre uma mudança abrupta na ramificação e a aplicação de critérios estatísticos, conforme destacado por Cruz *et al.* (2011).

O método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) é um método de agrupamento não ponderado que emprega médias aritméticas das medidas de dissimilaridade. Este método busca evitar a influência excessiva de valores extremos (máximo e mínimo) nas

medidas de dissimilaridade entre os genótipos considerados. Portanto, essa técnica resulta em uma representação gráfica da hierarquia de similaridade genética entre as amostras ou populações analisadas (Figura 2), facilitando a interpretação das relações evolutivas ou genéticas entre essas entidades conforme descrito Tikendra *et al.* (2019). A adequação dos resultados foi avaliada com o Coeficiente de Correlação Cofenético (CCC) atingindo 0,8275, refletindo em representações gráficas mais precisas (Manly, 2008).

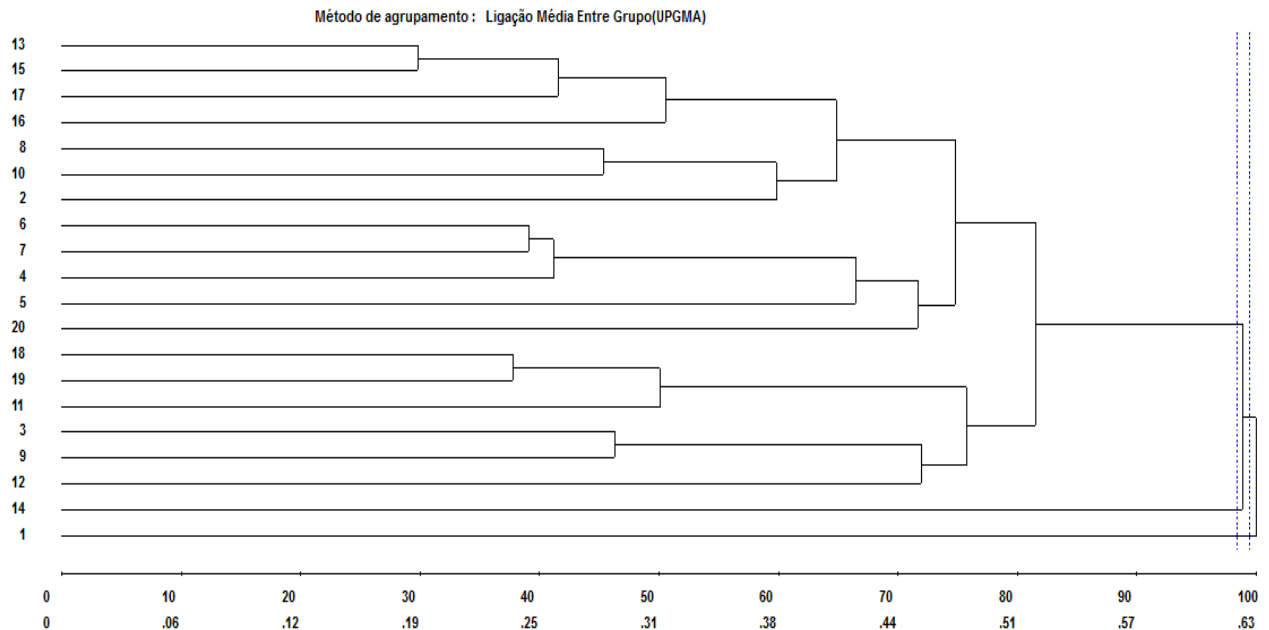


Figura 2. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, com base na matriz de dissimilaridade do índice de ‘Nei e Li’, gerada por dados binários de fragmentos ISSR amplificados em 20 acessos de Copaibeira.

Cuchi *et al.* (2023) preconizam a aplicação de múltiplos métodos de agrupamento ao conjunto de dados, sugerindo que o resultado mais aderente ao propósito da estratégia de conservação seja adotado. Essa abordagem visa evitar que a classificação seja meramente um artefato da técnica utilizada, uma vez que cada método impõe uma estrutura específica aos dados. O método de otimização mais amplamente empregado é o de ‘Tocher’, que adota o critério de estabelecer grupos de maneira que a distância média intra-grupos seja sempre inferior a qualquer distância inter-grupos (Rao, 1952). Dessa forma, é possível obter uma partição do conjunto de indivíduos em subgrupos mutuamente exclusivos, maximizando ou minimizando alguma medida predefinida.

O método ‘Tocher’ é frequentemente empregado em conjunto com o método ‘Hierárquico’ (UPGMA), os quais, em geral, costumam apresentar correspondências na alocação de acessos em grupos (Arriel *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2020; Souza *et al.*, 2021). No presente estudo, os agrupamentos resultantes dos dois métodos igualaram-se, sendo identificados os mesmos três grupos pelo método ‘Tocher’. Em termos gerais, os acessos (13,15,17,16,10,8,2,7,4,6,19,20,5,12,3,9) Grupo I, (4) Grupo II e (1) Grupo III coincidem nas categorias destacadas no agrupamento pelo método ‘Hierárquico’ (UPGMA) (Tabela 7).

Tabela 7. Agrupamento de 20 acessos da Copaibeira pelo método de Otimização de Tocher (matriz obtida do índice de ‘Nei e Li’), com base em 105 fragmentos amplificados por oligonucleotídeos ISSR - University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada).

Grupos	Acessos
I	13, 15, 17, 16, 10, 8, 2, 7, 4, 6, 19, 20, 5, 12, 3, 9, 18, 19
II	14
III	1

A categorização em três grupos de acessos não implica na segregação efetiva entre as cidades em questão. O Grupo I engloba os acessos tanto de Mirabela – MG (13, 15, 16, 10, 8, 2, 7, 4, 6, 5, 12, 3, 9) quanto de Montes Claros – MG (17, 18, 19, 20), enquanto os Grupos II e III referem-se exclusivamente a Mirabela – MG (14 e 1). Este desfecho evidencia que a diversidade dentro dos limites territoriais de Mirabela foi mais significativa do que a divergência observada entre as duas cidades.

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, é possível formular estratégias de conservação que se fundamentem na compreensão da diversidade genética das populações estudadas (Rodrigues; Garcia; Herrera, 2022). Ao discernir a variabilidade genética presente, é viável a identificação de locais propícios para a implementação de projetos de restauração, incrementando, assim, as perspectivas de reintrodução bem-sucedida (Reis; Tres; Scariot, 2007; Sartori; Coelho, 2023). A análise da distribuição geográfica das espécies permite a priorização de áreas com menor diversidade, como os acessos 13 e 15 que possuíram a menor dissimilaridade (19,04%), uma vez que a introdução de espécies com elevada variabilidade genética nessas regiões como os acessos 12 e 14 (75,38%), podem fomentar a reprodução cruzada entre subpopulações, desempenhando um papel crucial na manutenção da diversidade, conforme delineado por Schneider *et al.* (2023). Ademais, os resultados desta pesquisa podem servir como fundamentação para a seleção de populações com alta diversidade, visando estabelecer corredores ecológicos que conectem áreas fragmentadas, facilitando, assim, o fluxo gênico entre as populações (Correa; Oliveira; Araújo, 2020).

Além disso, o estudo proporciona uma base para a iniciativa de programas de cultivo *ex situ*, visando conservar o material genético em bancos de germoplasma (Junior *et al.*, 2021). A cultivar de populações com elevada diversidade genética contribui significativamente para prevenir o efeito gargalo genético (Feliciano *et al.*, 2021). Gestores envolvidos em estratégias de manejo adaptativo podem utilizar os resultados deste estudo para selecionar indivíduos capazes de enfrentar desafios ambientais, como mudanças climáticas, pragas e doenças, uma vez que marcadores moleculares possibilitam o monitoramento contínuo das populações ao longo do tempo (Yang; Francis, 2005).

RECONHECIMENTOS

Este estudo foi financiado pelo Projeto Biofábrica: Fortalecimentos da Agricultura Familiar e Meio Ambiente no Norte de Minas Gerais. Termo de Execução Descentralizada - TED entre a Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG e a Secretaria Especial de Agricultura Familiar e Desenvolvimento Agrário – SEAD do Governo Federal Brasileiro (Processo 55000.003361/2016-75). A bolsa acadêmica foi viabilizada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais da UFMG, Brasil.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não ter conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

Agwanda CO, et al. (1997). Identificação de marcadores RAPD para resistência à doença dos frutos do café, *Colletotrichum kahawae*, em café arábica. *Eufítica*. 97:241-248.

Al-Hadeithi ZSM, Jasim SA. (2021). Study of Plant Genetic Variation through Molecular Markers: An Overview. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 33:45.464-473.29. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/355209378_Study_of_Plant_Genetic_Variation_throu

gh_Molecular_Markers_An_Overview].

Alves FAL. (2021). Utilização de técnicas de análise multivariadas no estudo da diversidade genética em quixabeira (*Sideroxylon obtusifolium*). *Pesquisa Agropecuária Pernambucana*. 26:1. Disponível em: [https://pap.emnuvens.com.br/pap/article/view/235/126].

Amaral DOJD, et al. (2019). Seleção de primers polimórficos para estudo de diversidade genética em cactáceas. *Multi-Science Journal*. 2:3. 9-13. Disponível em [https://doi.org/10.33837/msj.v2i3.1074].

Arriel NHC, Mauro AO, Cruz CD, Mauro SMZ, Costa MM, et al. (2006). Comparison of similarity coefficients in sesame cultivars clustering using RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 4:192-199.

Ataíde TH, et al. (2019). PEQUI do cerrado ao Bistrô. Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – CES/JF. *Revista de Gastronomia*. 1:1. Disponível em: [https://seer.uniacademia.edu.br/index.php/revistadegastronomia/article/view/1864/1204].

Brody JR, Kern SE. (2004). Sodium boric acid: a Tris-free cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques, Natick, Mass.* 36:2. 214-216. Disponível em: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14989083/].

Caballero A, Rodríguez RST, Ávila V, Fernández J. (2010). Management of genetic diversity on subdivided populations in conservation programmes. *Conservation Genetics*. 11:1.409 – 419. Disponível em: [https://link.springer.com/article/10.1007/s10592-009-0020-0].

Caixeta ET, Oliveira ACB, Brito GG, Sakiyama NS. (2016). Tipos de Marcadores Moleculares In: Marcadores Moleculares (Borém EA, Caixeta ET).

Carvalho PER. (2009). Pequiizeiro - *Caryocar brasiliense*. Colombo: Embrapa Florestas. Comunicado Técnico. Disponível em [https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/578664/1/CT230.pdf].

Chagas KPT, et al. (2015). Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de Elaeis guineenses. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 10:1.147-152. Disponível em [http://www.agraria.pro.br/ojs32/index.php/RBCA/article/view/v10i1a5133/614].

Charlesworth B. (2009). Fundamental concepts in genetics: Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nature Reviews Genetics*. 10:3. 195–205. Disponível em [https://www.nature.com/articles/nrg2526].

Coelho VO, et al. (2020). Fauna edáfica como bioindicadora da qualidade do solo em áreas sob diferentes sistemas de manejo no cerrado. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Disponível em [https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UFTM_3865f7262dbaed2ed4545b8ad107fb6a].

Correia JN, Oliveira VPS, Rezende TMA. (2020). Avaliação, Conservação e Recuperação de Nascentes em Bacias Hidrográficas. *Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego*. 14:2.274-290. Disponível em [https://doi.org/10.19180/2177-4560.v14n22020p274-290].

Costa DF, Vieira FA, Fajardo CG, Chagas KPT. (2015). Diversidade genética e seleção de iniciadores ISSR em uma população natural de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 37:1.970-976. Disponível em

[<https://www.scielo.br/j/rbf/a/3YBVKKSq8ggfYQWtBbsCymQ/>].

Cruz CD. (2013). Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy*. 35:3. 271-276. Disponível em: [<https://doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.21251>].

Cuchi G, et al. (2023). Caracterização molecular de etnovarietades de *Manihot esculenta* Crantz com utilização de marcadores moleculares ISSR. *Conjecturas*. 22:13. Disponível em [<https://doi.org/10.53660/CONJ-1705-2H70>].

Cunha BAD, et al. (2020). Agronomic potential and genetic dissimilarity among coffee cultivars: Hierarchical method and optimization. *Research, Society and Development*. 9:9. e561997468. Disponível em [<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/7468>].

Derengoski JÁ, et al. (2022). Macrofauna epiedáfica em áreas submetidas a tecnologias de restauração florestal no sul do Brasil. *Ciência Florestal*. 32:3. Disponível em: [<https://www.scielo.br/j/cflo/a/7r4MZ5Ck5sFMhgk49chLdpD/#>].

Domingues SD, et al. (2017). Seleção de primers para análise de Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) em *Cereus* sp.(Cactaceae) Seleção de primers para Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) em *Cereus* sp.(Cactaceae). *Revista Biotecnologia & Ciência*. 6:2. 46-54. Disponível em [<https://www.revista.ueg.br/index.php/biociencia/article/view/6799>].

Doyle JJ, Doyle JL. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12:1. 13-15.

Feliciano DC, et al. (2021). *Portulaca Hatschbachii*: baixa diversidade genética reforça a necessidade de conservação dessa espécie herbácea categorizada como “em perigo” de extinção. *Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente*. 2:2. 11-11. Disponível em [<https://doi.org/10.51189/rema/1230>].

Felix FC, et al. (2020). Aplicações de Marcadores ISSR em Estudos de Diversidade Genética de *Pityrocarpa moniliformis*. *Revista Caatinga*. 33:4. 1017-1024. Disponível em [<https://doi.org/10.1590/1983-21252020v33n417rc>].

Ferreira ME, Grattapaglia D. (1998). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. *Embrapa-Cenargen*. 1:1. 200.

Ferreira SMR, Bartachevits ELF. (2022). Sociobiodiversity and Sovereignty and Food and Nutritional Security as an inseparable right to adequate and healthy food. *Health Sciences*. 11:1. Disponível em [<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/25161>].

Garcia DCF, et al. (2020). Análise da Diversidade Genética do Baru usando Marcadores Moleculares ISSR. *Brazilian Journal of Development*. 6:7 48949-48960. Disponível em: [<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/13585>].

Godwin ID, Aitken EAB, Smith LW. (1997). Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*. 18:1524- 1528. Disponível em: [<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.1150180906>].

Gomes BH, et al. (2022). Genetic diversity and correlation between morphological traits of pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb.) with and without thorns at the endocarp. *Na Acad Bras Cienc*. 94. Disponível em [<https://www.scielo.br/j/aabc/a/NHngf4Wv7mybBccKyHScg9c/?format=pdf&lang=en>].

Jiao Y, Zan LS, Liu YF, Wang HB, Guo BL. (2010). A novel polymorphism of the MYPN gene and its association with meat quality traits in *Bos taurus*. *Genet Mol Res*. 9:3. 1751-1758. Disponível em: [<https://www.geneticsmr.com/articles/964>].

Junior JCC, et al. (2021). Avaliação da diversidade genética de *Capsicum* spp. com base em descritores morfoagronômicos e bromatológicos. *Revista Ifes Ciência*. 7:1. 01-11. Disponível em: [<https://doi.org/10.36524/ric.v7i1.1143>].

Kuhlmann M. (2018). Frutos e sementes do Cerrado: espécies atrativas para a fauna. 1. ed. Brasília.

Lisboa MC. et al. (2020). Oleochemistry potential from Brazil northeastern exotic plants. *Biochime*. 178:1. 96-104. Disponível em [<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030090842030208X>].

Lopes JDS, Costa MRJ, Arriel DAA. (2020). Genetic diversity of potential mother trees of *Myracrodruon urundeuva* Allemão in a remnant population from Brazilian Cerrado using ISSR. *Advances in Forestry Science*. 7. 1017-1024.

Lorenzi H. (2008). Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum.

Maltezo DP, Medeiros JD, Rossi AAB. (2021). Genetic structure and diversity among individuals of *Copaifera langsdorffii* Desf. from Mato Grosso, Brazilian Amazon, using ISSR markers. *Research, Society and Development*. 10:16. Disponível em [<http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i16.23025>].

Manly BFJ. (2008). Métodos estatísticos multivariados: uma introdução (tradução Sara Ianda Carmona). 3 ed. Porto Alegre: Bookman.

Mir MA, Mansoor S, Sugapriya M, Alyemeni MN, Wijaya L, Ahmad P. (2021). Deciphering genetic diversity analysis of saffron (*Crocus sativus* L.) using RAPD and ISSR markers. *Saudi journal of biological sciences*. 28:2. 1308-1317. Disponível em: [<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.063>].

Mojena R. (1977). Hierarchical grouping method and stopping rules: an evaluation. *Computer Journal*. 20:1. 359-363.

Morillo AC, Mora MS, Morillo Y. (2022). Análise da diversidade genética da fruta do dragão com base em marcadores ISSR na Colômbia. *Brazilian Journal of Biology*. 82:1. Disponível em: [<https://doi.org/10.1590/1519-6984.256451>].

Ng WL, Tan SG. (2015). Marcadores Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR): Estamos fazendo certo?. *Revista Científica ASM*. 9:1.30-39.

Oliveira CS, Nunes GLE, Coutinho MP, Peixoto N, Gatto A. (2017). Aspectos Socioambientais da Comercialização. *Floresta e Ambiente*. 2:1. Disponível em: [<https://doi.org/10.1590/2179-8087.058213>].

Pieri FA, Mussi MCM, Moreira MA. (2009). Óleo de Copaíba (*Copaifera* sp.): Histórico, Extração, Aplicações Industriais e Propriedades Medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 11:4. 465-472. Disponível em [<https://www.scielo.br/j/rbpm/a/54wyKL9fqFpDcfSpshDVv5G/?format=pdf>].

Pimenta JMA, et al. (2022). Selection of ISSR Molecular Primers For Studies of Genetic Diversity In *Handroanthus Impetiginosus* (Mart. Ex Dc.) Mattos. *Revista Caatinga*. 35:1. 231-238. Disponível em [<https://periodicos.ufersa.edu.br/caatinga/article/view/9903>].

Rao RC. Advanced statistical methods in biometric research. 1º ed. John Wiley and Sons, New York.

Reis A, Tres DR, Scariot EC. (2007). Restauração na Floresta Ombrófila Mista através da sucessão natural. *Pesquisa Florestal Brasileira*. 55:1. 67-67. Disponível em: [<https://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/120>].

Rogrigues M, Garcia M, Herrera R. (2022). Lacunas e tendências em estudos de diversidade genética de 4 espécies Amazônicas. *Diversity*. 14:1. 25-45.

Sambrook J, Fritsch ER, Maniatis TEF. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 1º ed. Cold Spring Harbour Labs, New York.

Sartori MA, Coelho GTDCP. (2023). Utilização de indicadores biológicos e uso de retentores de sedimentos na restauração florestal e recuperação de áreas degradadas. *Revista Maestria*. 18:1. 67-76. Disponível em: [<https://revista.unifemm.edu.br/index.php/Maestria/article/view/82/95>].

Schneider CR, et al. (2023). Espécies, práticas silviculturais e monitoramento: estratégias para restauração ecológica de áreas protegidas da Mata Atlântica. *Ciência Florestal*. 33:4. Disponível em: [<https://www.scielo.br/j/cflo/a/CQvYVP7pvLnvFjtZ34fWKdd/>].

Silva FHL, Fernandes JSC, Esteves EA, Titon M, Santana RC. (2012). Populações, matrizes e idade da planta na expressão de variáveis físicas em frutos do pequizeiro. *Rev Bras Frutic*. 34:3. 806-813. Disponível em: [<https://www.scielo.br/j/rbf/a/RHhz5dLmFmGHDS5SfsYLWkF/abstract/?lang=pt>].

Silva GP, Souza RS. (2022). Os circuitos curtos de comercialização e consumo de Santiago (RS). *Open Science Research III*. 3:1. Disponível em [<https://downloads.editoracientifica.com.br/articles/220308230.pdf>].

Silva JB, Filho JTC. (2021). Influência de Métodos de Superação de Dormência e do Armazenamento na Germinação de Sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae). In: Livro de Resumos 37º Reunião Nordestina de Botânica (Shinya TY, Vilarinho MP, eds.) Campo Maior.

Silva MD. (2011). Cadeia produtiva de pequi no Estado de Goiás: análise do ambiente organizacional e institucional. 1º ed. Planaltina: Universidade de Brasília.

Silva MNSD. (2009). Territorialidades do Pequi: Montes Claros e o Norte de Minas em questão. *Anais eletrônicos*. 1:1. Disponível em [http://www.geografia.fflch.usp.br/inferior/laboratorios/agraria/Anais%20XIXENGA/artigos/Silva_MNS].

Sokal RR, Rohlf FJ. (1962). The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon*. 11:1. 33-40. Disponível em [<https://doi.org/10.2307/1217208>].

Souza AVV, et al. (2021). Genetic diversity in amburana (*amburana cearensis*) accessions: hierarchical and optimization methods. *Revista Árvore*. 45:1. Disponível em: [<https://doi.org/10.1590/1806-908820210000008>].

- Souza LC, Silva JAL, Miranda FD, Souza MC, Kunz SH, Pereira AG. (2018). Validação do marcador molecular ISSR para detecção de diversidade genética em *Plathymenia reticulata* Benth. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. 13:1. 1-6. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/324095968_Validacao_do_marcador_molecular_ISSR_para_deteccao_de_diversidade_genetica_em_Plathymenia_reticulata_Benth].
- Tikendra L, Amom T, Nongdam P. (2019). Molecular genetic homogeneity assessment of micropropagated *Dendrobium moschatum* Sw.-A rare medicinal orchid, using RAPD and ISSR markers. *Plant Gene*. 19:1. Disponível em: [<http://dx.doi.org/10.1016/j.plgene.2019.100196>].
- Trindade R, Silva JK, Setzer WN. (2018). Copaifera of the Neotropics: A Review of the Phytochemistry and Pharmacology. *International Journal of Molecular Science*. 19:5. 1-33. Disponível em: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5983702/>].
- Turchetto C, et al. (2007). Marcadores genéticos baseados em DNA. Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações. 1º ed. Sociedade Brasileira de Genética, São Paulo.
- Vasques AGEBC, Costa MK, Leite AV. (2023). A importância da polinização biótica em cultivos agrícolas no Brasil. *Diversitas Journal*. 8:1. Disponível em: [<https://doi.org/10.48017/dj.v8i1.2342>].
- Vilela GF, Carvalho D, Vieira FA. (2008). Fenologia de *Caryocar brasilense* Camb. (Caryocaraceae) no alto Rio Grande, sul de Minas Gerais. *Revista Cerne*. 14:4. 317-329.
- Yang Q, et al. (2011). Differentiation between populations of Japanese grenadier anchovy (*Coilia nasus*) in Northwestern Pacific based on ISSR markers: Implications for biogeography. *Biochemical Systematics and Ecology*. 39. 286-296.
- Yang W, Francis DM. (2005). Marker-assisted selection for combining resistance to bacterial spot and bacterial speck in tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*. 130:1. 716-721.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A conclusão deste estudo revela que a copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) apresentou significativa diversidade genética, evidenciada pela ampla polimorfia observada em 11 dos 16 oligonucleotídeos ISSR testados. Em contraste, o pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) apenas quatro dos cem oligonucleotídeos testados manifestaram polimorfismo, inviabilizando a construção de matrizes binárias viáveis para a estimação das dissimilaridades. O contraste no resultado dessas espécies pode ser atribuído a diversas causas, incluindo características biológicas, histórico evolutivo e peculiaridades genéticas.

No entanto, uma consideração relevante é a possível inadequação dos marcadores moleculares ISSR para discriminar os indivíduos do pequizeiro. A baixa taxa de polimorfismo observada pode ser resultado de limitações intrínsecas do marcador molecular, como a falta de regiões altamente variáveis no genoma do pequi ou a incompatibilidade entre os oligonucleotídeos ISSR e as sequências genômicas específicas dessa espécie. A compreensão das causas subjacentes à falta de polimorfismo no pequizeiro permite direcionar futuras pesquisas para o desenvolvimento e aplicação de outros oligonucleotídeos.

Com relação à copaíba, a diversidade genética aferida pode constituir uma relevante aliada, pois estará contribuindo simultaneamente para a preservação da biodiversidade e para o avanço de uma silvicultura mais sustentável. Essa diversidade genética também pode ser explorada em programas de melhoramento genético, visando aprimorar características desejáveis, como a produção de óleo com propriedades específicas. Além disso, a compreensão da diversidade genética na copaíba tem implicações importantes para a conservação da biodiversidade em ecossistemas onde a espécie é naturalmente encontrada, como o Cerrado. Estratégias eficazes de preservação e manejo sustentável podem ser desenvolvidas com base no conhecimento genético, contribuindo para a proteção não apenas da copaíba, mas também de todo o ecossistema ao seu redor, como a prevenção da fragmentação do habitat, implementação de corredores ecológicos e efetiva reintrodução da espécie.

ANEXOS

As Figuras (3 a 12) referem-se aos procedimentos moleculares realizados no âmbito do trabalho de Dissertação do acadêmico Pedro Vitor de Souza Silva (Laboratório de Biotecnologia - CPCA), Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais.

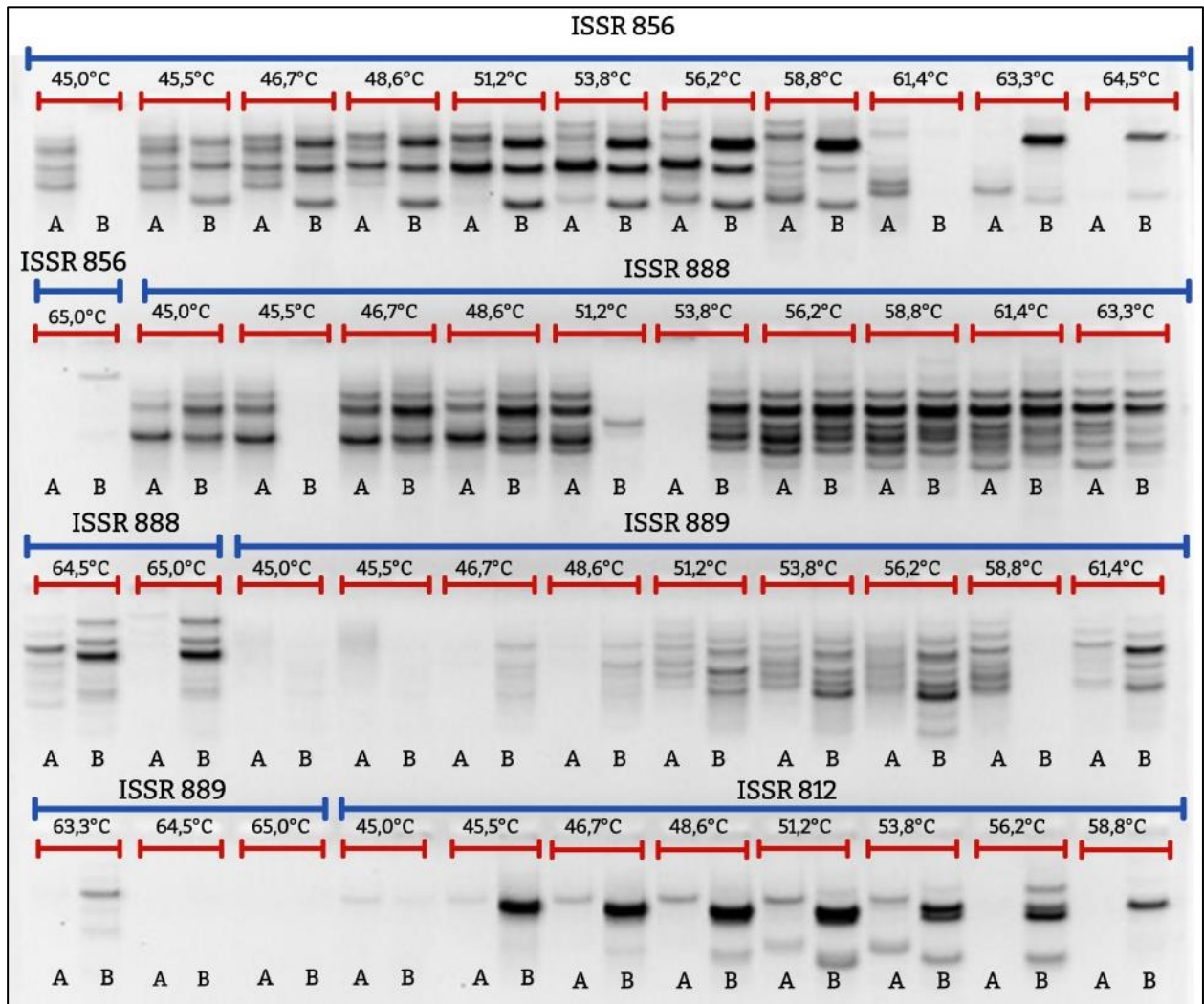


Figura 3. Padrões eletroforéticos em testes de gradientes de temperaturas para acessos de copaibeiras (Oligonucleotídeos ISSR 856, 888, 889 e 812). As letras A e B referem-se a dois genótipos escolhidos aleatoriamente da população. As linhas vermelhas indicam as temperaturas de anelamento, e as azuis os oligonucleotídeos escolhidos.

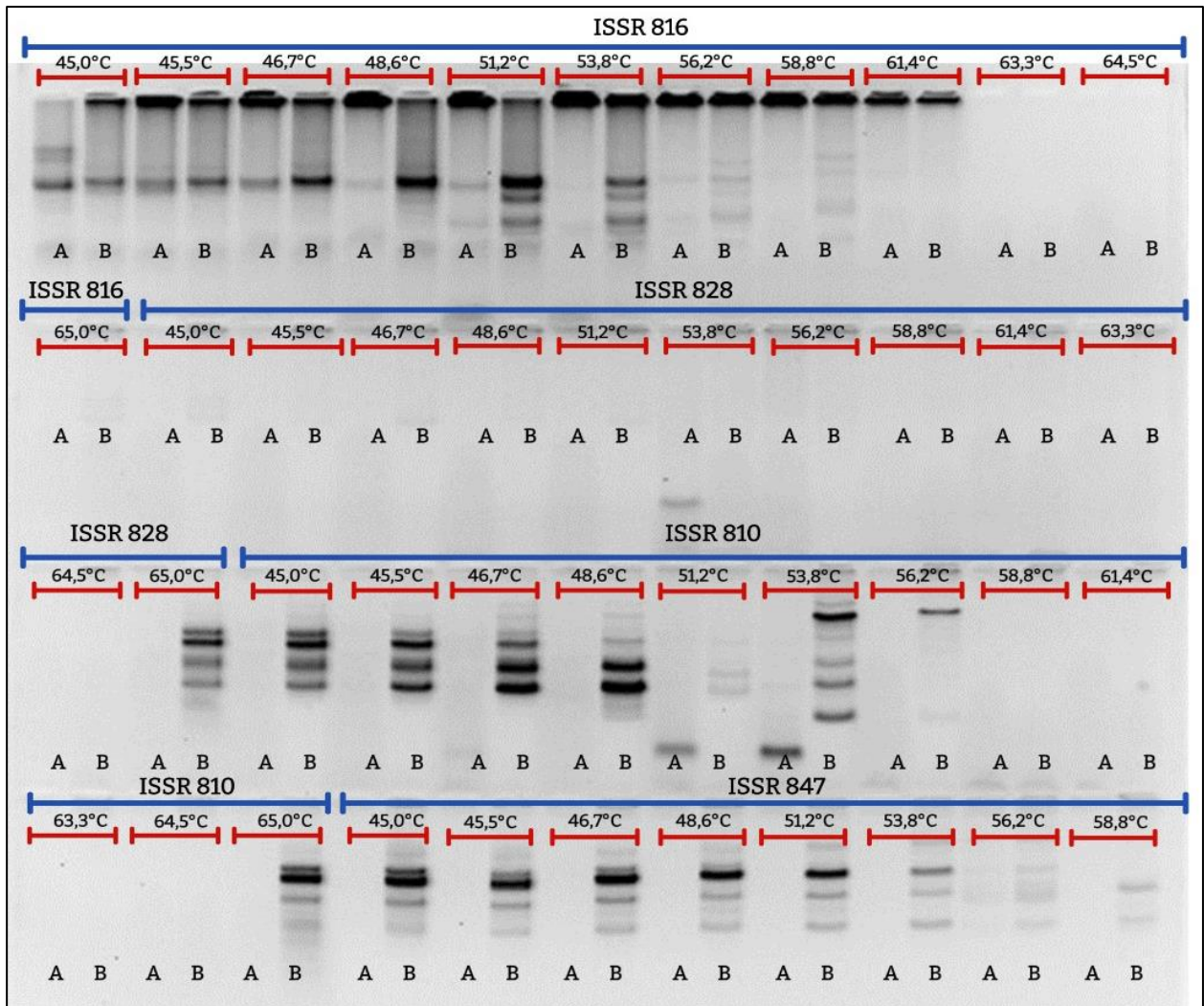


Figura 4. Padrões eletroforéticos em testes de gradientes de temperaturas para acessos de copaibeiras (Oligonucleotídeos ISSR 816, 828, 810 e 847). As letras A e B referem-se a dois genótipos escolhidos aleatoriamente da população. As linhas vermelhas indicam as temperaturas de anelamento, e as azuis os oligonucleotídeos escolhidos.

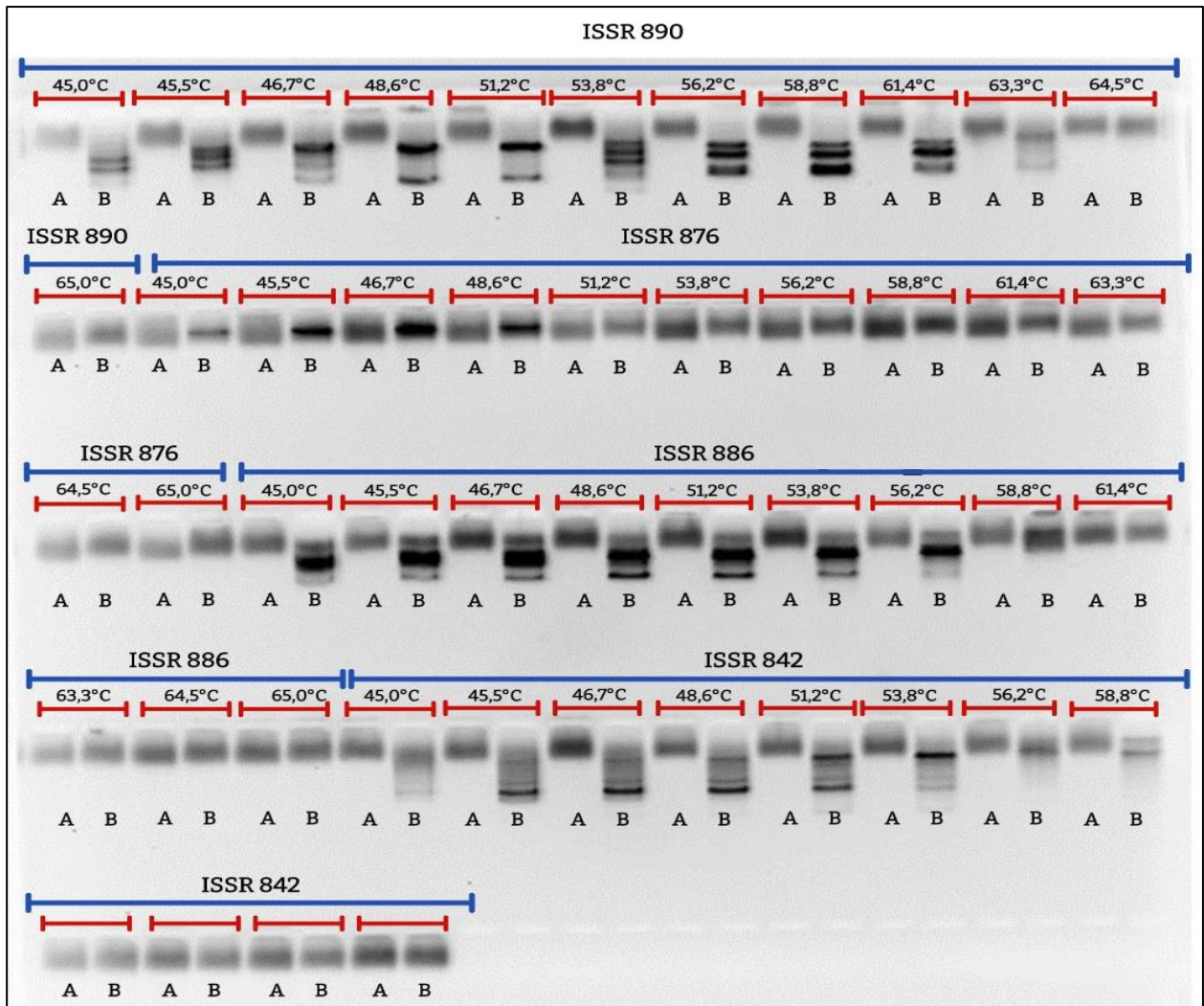


Figura 5. Padrões eletroforéticos em testes de gradientes de temperaturas para acessos de copaibeiras (Oligonucleotídeos ISSR 890, 876, 886 e 842). As letras A e B referem-se a dois genótipos escolhidos aleatoriamente da população. As linhas vermelhas indicam as temperaturas de anelamento, e as azuis os oligonucleotídeos escolhidos.

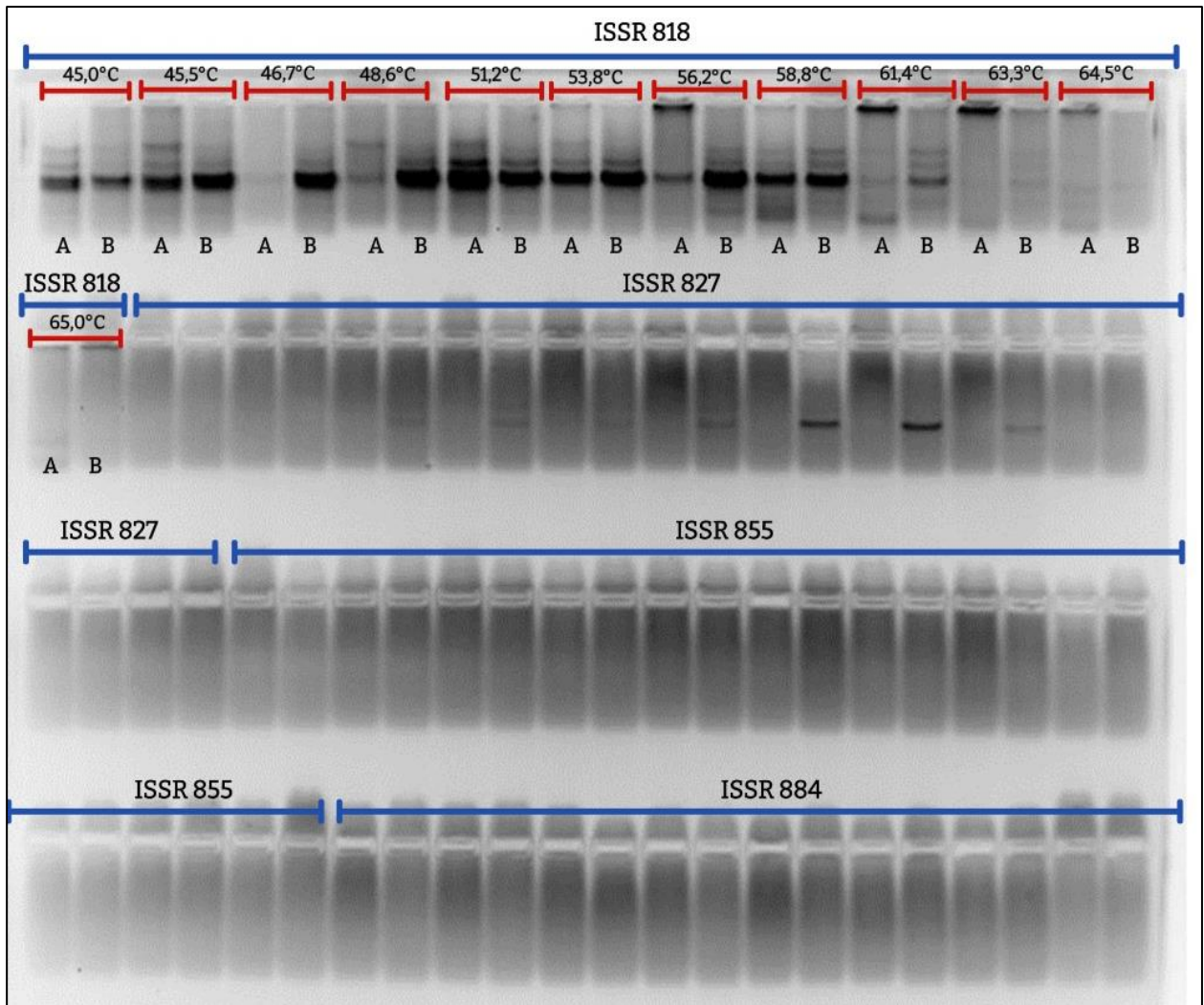


Figura 6. Padrões eletroforéticos em testes de gradientes de temperaturas para acessos de copaibeiras (Oligonucleotídeos ISSR 818, 827, 855 e 884). As letras A e B referem-se a dois genótipos escolhidos aleatoriamente da população. As linhas vermelhas indicam as temperaturas de anelamento, e as azuis os oligonucleotídeos escolhidos.

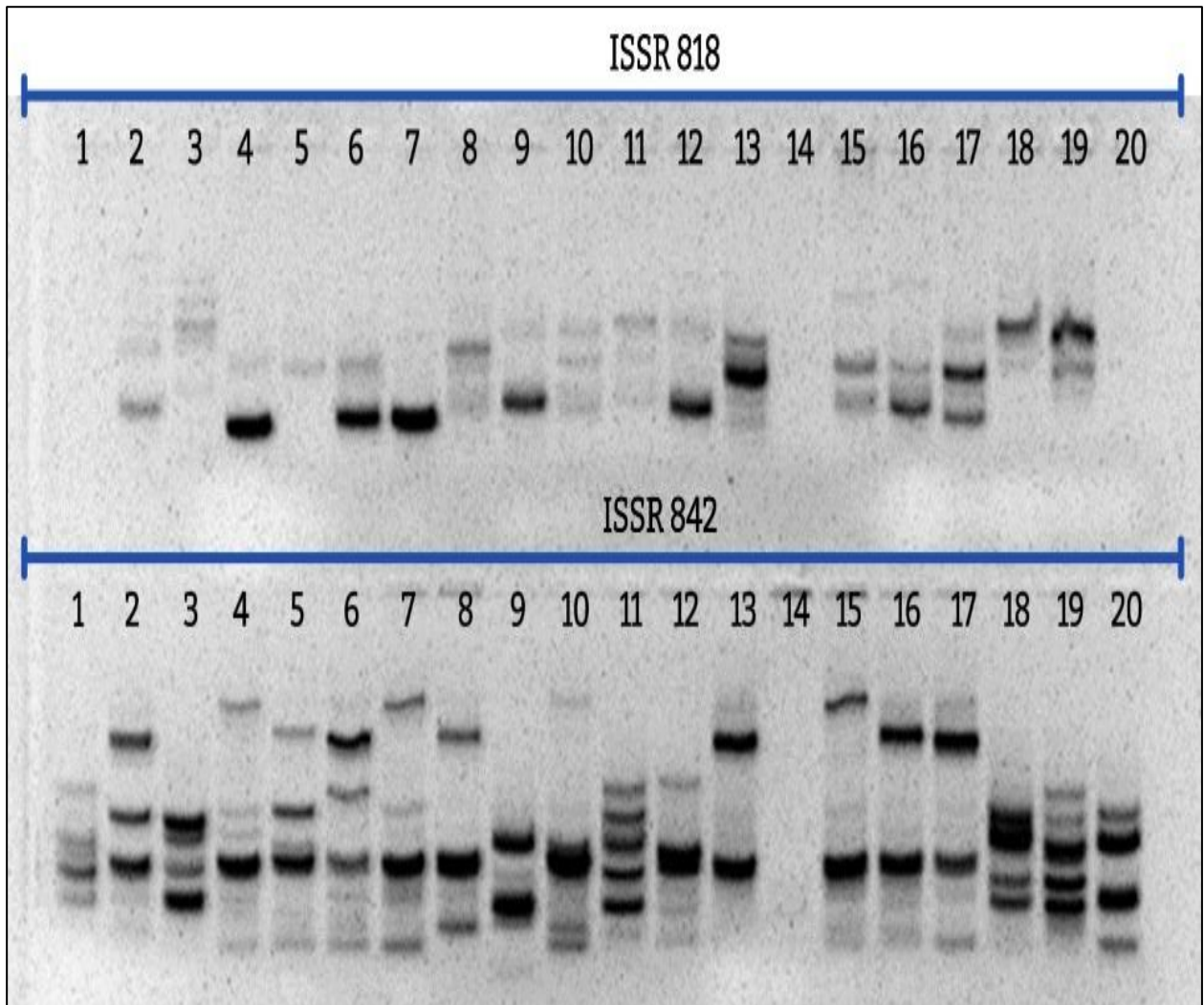


Figura 7. Padrões eletroforéticos a partir das ampliações via PCR dos genomas de 20 acessos das Copaiibeiras (Oligonucleotídeo ISSR 818) Ta: 61°C; (Oligonucleotídeo ISSR 842) Ta: 51°C.

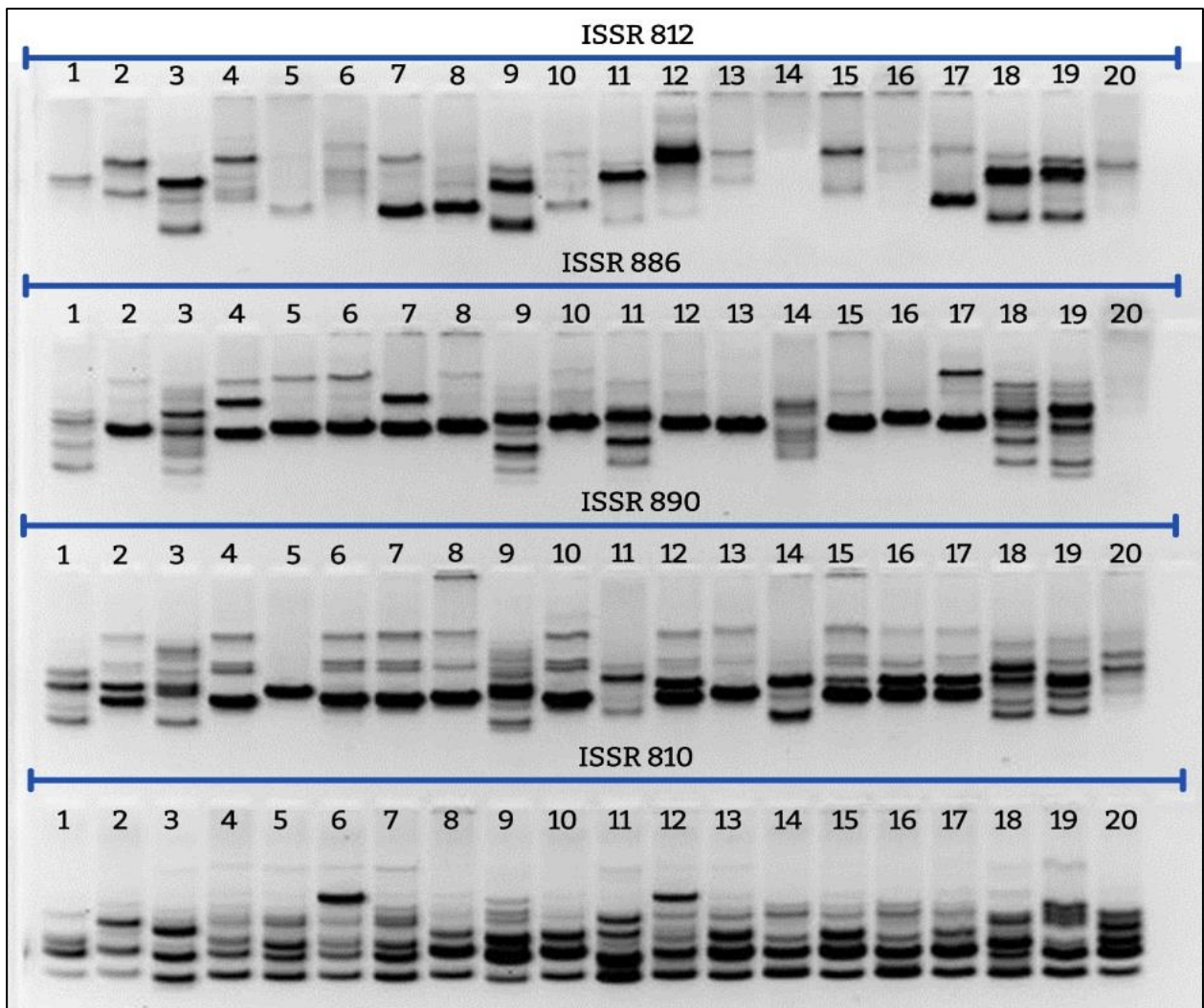


Figura 8. Padrões eletroforéticos a partir das ampliações via PCR dos genomas de 20 acessos das Copaiibeiras (Oligonucleotídeos ISSR 812, 886 e 890) Ta: 54°C; (Oligonucleotídeo ISSR 810) Ta: 56°C.

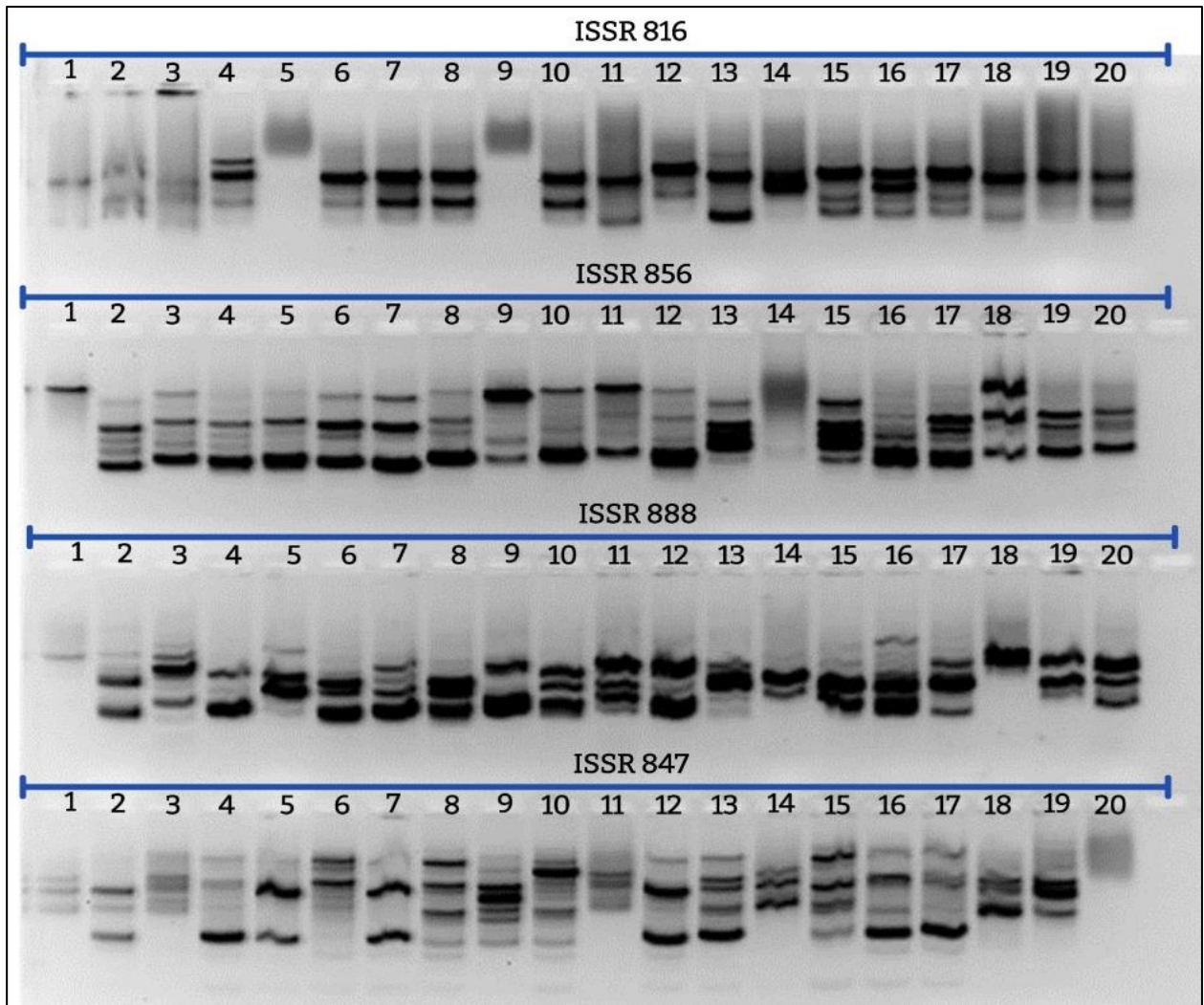


Figura 9. Padrões eletroforéticos a partir das ampliações via PCR dos genomas de 20 acessos das Copaibeiras (Oligonucleotídeos ISSR 816 e 856) Ta: 59°C; (Oligonucleotídeo ISSR 888) Ta: 63°C; (Oligonucleotídeo ISSR 847) Ta: 45°C.

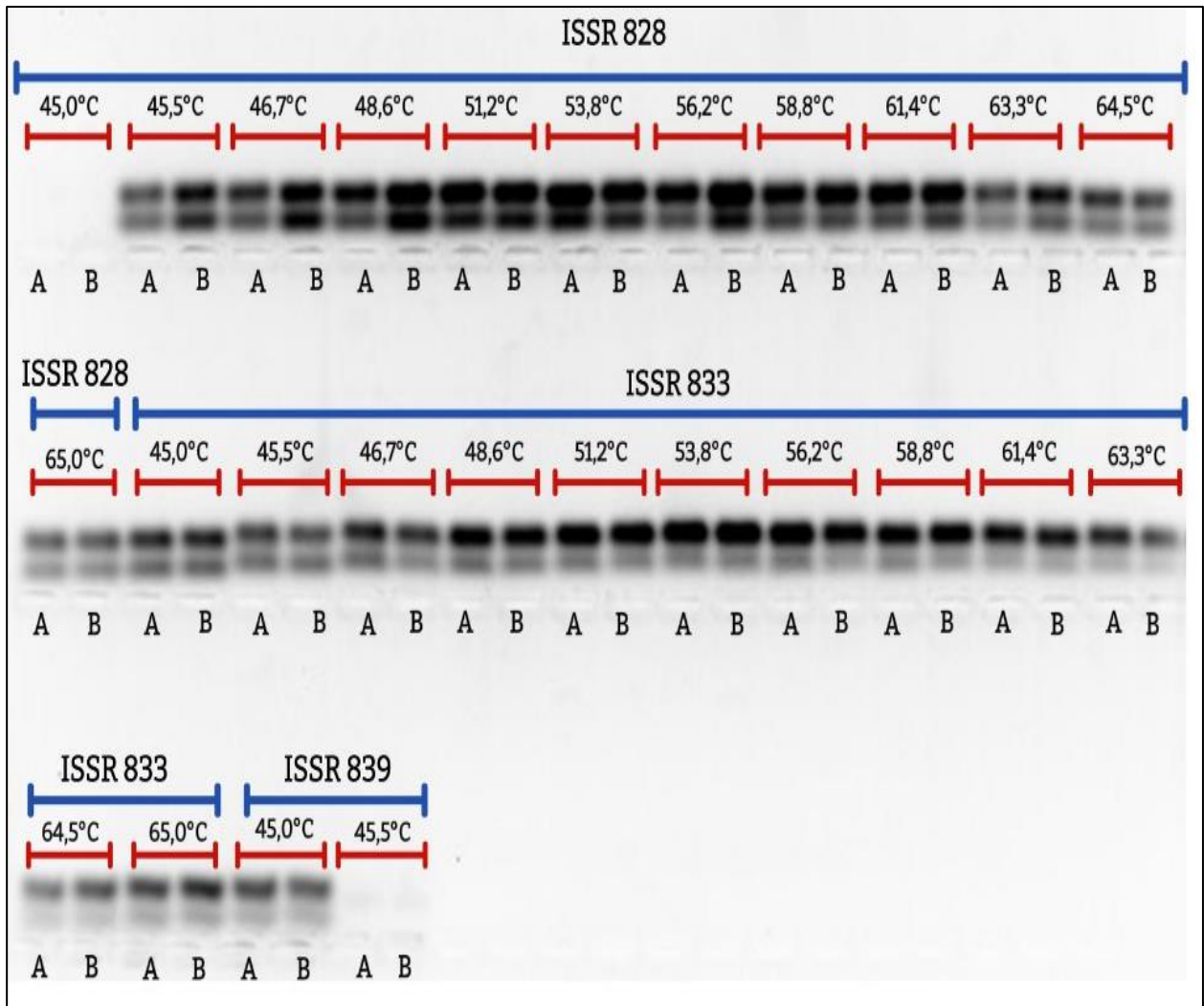


Figura 10. Padrões eletroforéticos em testes de gradientes de temperaturas para acessos de pequiyeiros (Oligonucleotídeos ISSR 828, 833, 839 e 845). As letras A e B referem-se a dois genótipos escolhidos aleatoriamente da população. As linhas vermelhas indicam as temperaturas de anelamento, e as azuis os oligonucleotídeos escolhidos.

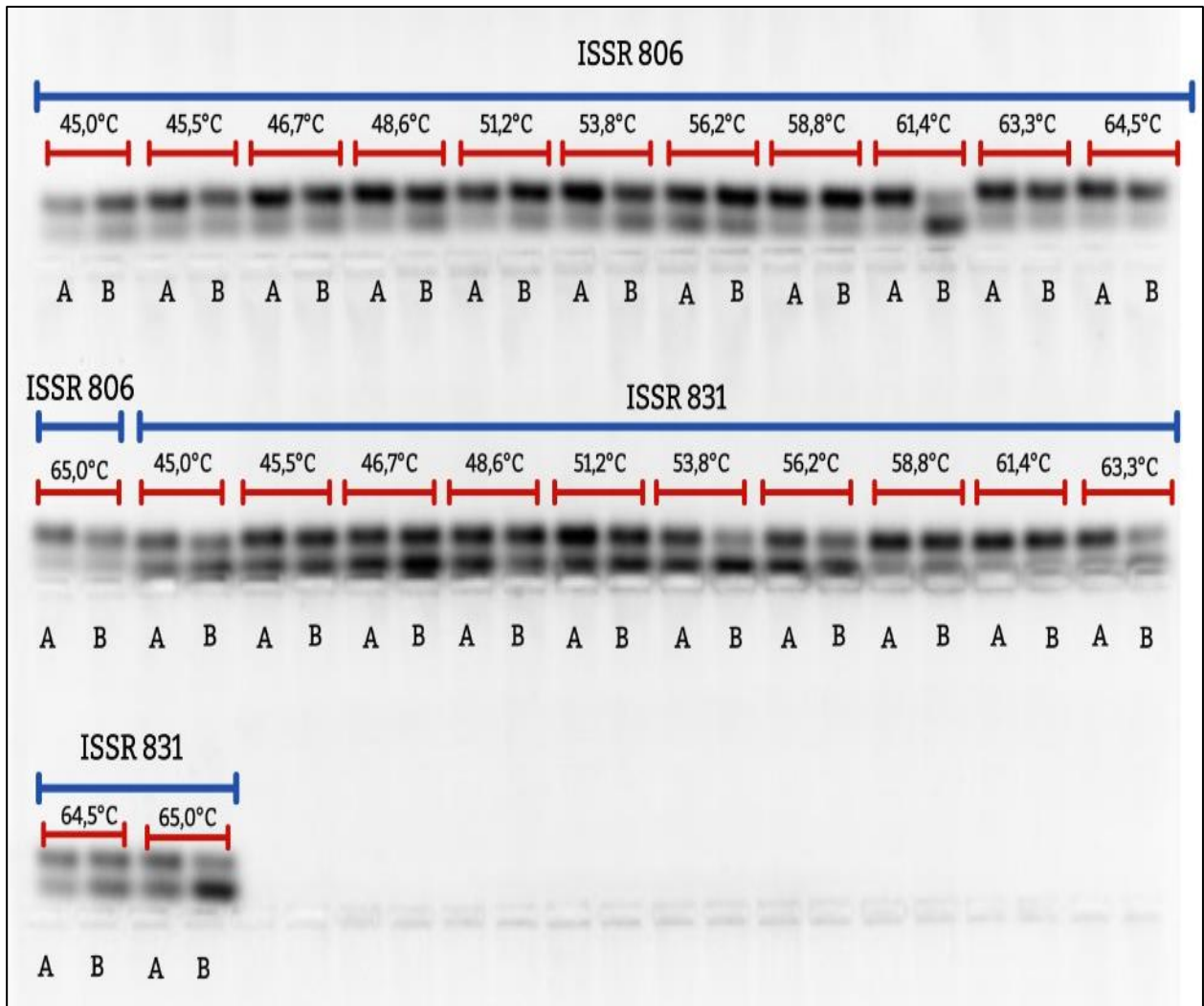


Figura 11. Padrões eletroforéticos em testes de gradientes de temperaturas para acessos de pequizeiros (Oligonucleotídeos ISSR 806 e 831). As letras A e B referem-se a dois genótipos escolhidos aleatoriamente da população. As linhas vermelhas indicam as temperaturas de anelamento, e as azuis os oligonucleotídeos escolhidos.

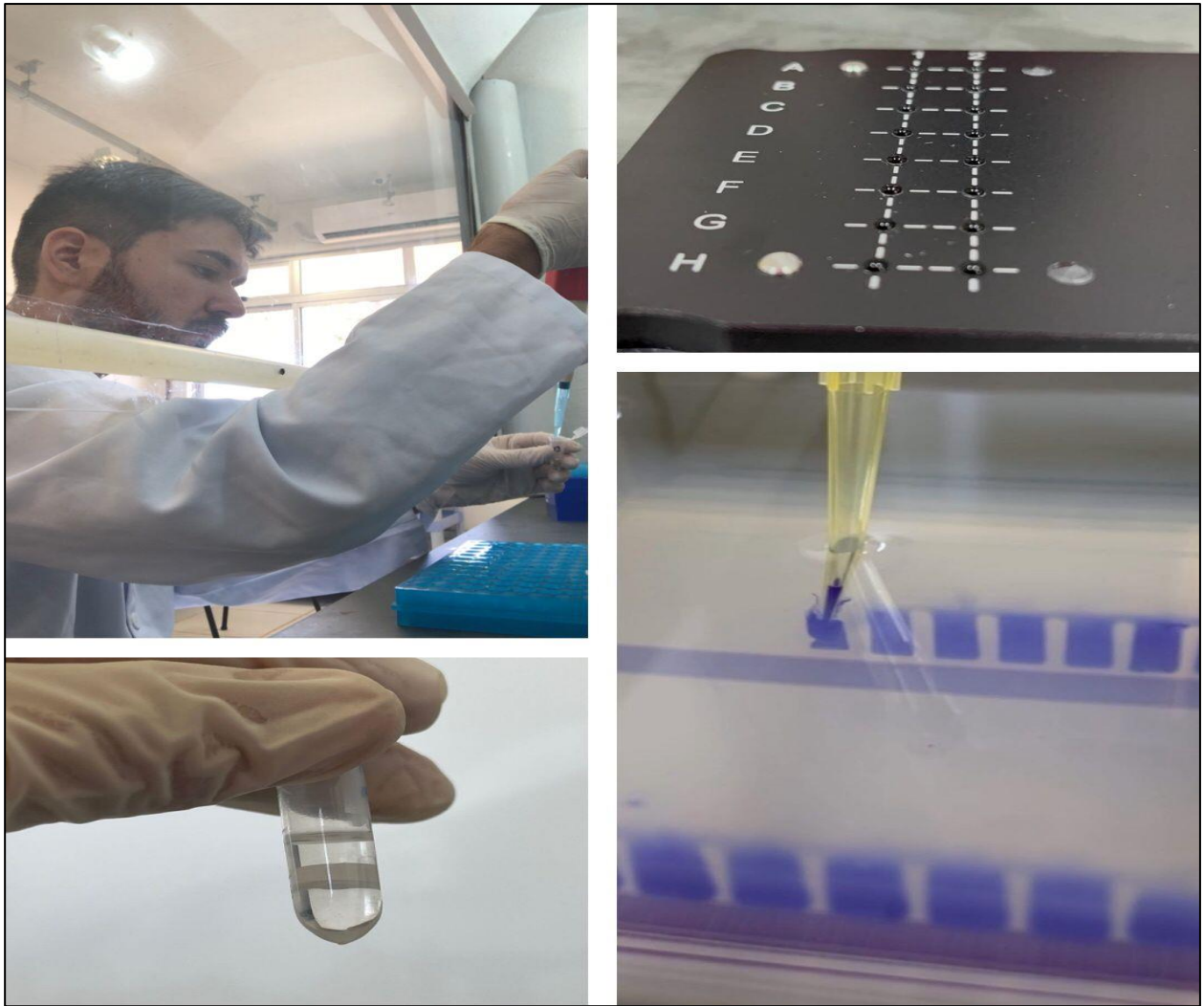


Figura 12. Recortes dos passos envolvendo a execução do trabalho - Laboratório de Biotecnologia, Centro de Pesquisas em Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, MG, Brasil.