



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES E ESTRUTURA GENÉTICA DE
Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae).**

Andréia Juliana Leite Rodrigues

Orientador:

Prof. Dr. Lázaro José Chaves

Co-Orientadores:

Dra. Ana Yamaguishi Ciampi

Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho

Abril – 2009



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
DE TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

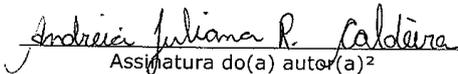
Nome completo do autor: Andreia Juliana Rodrigues Caldeira

Título do trabalho: DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES E ESTRUTURA GENÉTICA DE *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae).

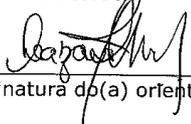
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 03 / 05 / 18

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

- Casos de embargo:
- Solicitação de registro de patente
 - Submissão de artigo em revista científica
 - Publicação como capítulo de livro
 - Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

ANDRÉIA JULIANA LEITE RODRIGUES

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES E ESTRUTURA GENÉTICA DE
Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae).**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia, área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador:

Prof. Dr. Lázaro José Chaves

Co-Orientadores:

Dra. Ana Yamaguishi Ciampi

Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho

Goiânia, GO – Brasil
2009

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Leite Rodrigues, Andreia Juliana
DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES E
ESTRUTURA GENÉTICA DE *Hancornia speciosa* Gomes
(Apocynaceae). [manuscrito] / Andreia Juliana Leite Rodrigues. -
2009.
CXI, 111 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Lázaro José Chaves; co-orientadora Dra.
Ana Ciampi; co-orientador Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Agronomia e Engenharia de Alimentos (EAEA), Programa de Pós
Graduação em Agronomia, Cidade de Goiás, 2009.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, mapas, fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas,
algoritmos, lista de figuras, lista de tabelas.

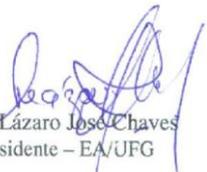
1. Mangaba. 2. MICROSSATÉLITE. 3. estrutura genética. 4.
Cerrado. 5. Biodiversidade. I. José Chaves, Lázaro, orient. II. Título.

CDU 633

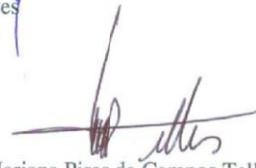


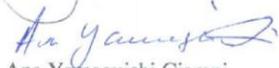
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
 ESCOLA DE AGRONOMIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE ANDRÉIA JULIANA LEITE RODRIGUES - Aos vinte e nove dias do mês de abril do ano de dois mil e nove (29/04/2009), às 14h00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Prof. Lázaro José Chaves – Orientador, Prof. Sérgio Tadeu Sibov, Prof^ª. Mariana Pires de Campos Telles, Dr^ª. Ana Yamaguishi Ciampi e Prof^ª. Flávia Melo Rodrigues, para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no auditório do PPGA da EA/UFG, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: “Desenvolvimento de marcadores microssatélites e estrutura genética de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae)”, em nível de **Doutorado**, área de concentração em **Genética e Melhoramento de Plantas**, de autoria de **Andréia Juliana Leite Rodrigues**, discente do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente da Banca Examinadora, Prof. Lázaro José Chaves, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra a seguir, foi concedida a autora da tese que, em 40 minutos apresentou o seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca argüiu a examinanda, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 658/2004 do CEPEC - Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura, que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Agronomia e procedidas às correções recomendadas, a tese foi **APROVADA** por unanimidade, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **DOCTORA EM AGRONOMIA**, na área de concentração em **GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS** pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGA da versão definitiva da tese, com as devidas correções. A Banca Examinadora recomenda a publicação de artigos científicos, oriundos dessa tese, em periódicos de circulação nacional e, ou, internacional, depois de procedidas às modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades de pauta, às 18h00min a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e, para constar, eu, Welinton Barbosa Mota, secretário do PPGA, lavrei a presente Ata, que depois de lida e aprovada será assinada pelos membros da Banca Examinadora em quatro vias de igual teor.


 Prof. Lázaro José Chaves
 Presidente – EA/UFG


 Prof. Sérgio Tadeu Sibov
 ICB I/UFG


 Prof^ª. Mariana Pires de Campos Telles
 ICB I/UFG


 Dr^ª. Ana Yamaguishi Ciampi
 Embrapa - Cenargen


 Prof^ª. Flávia Melo Rodrigues
 UEG - Anápolis

“A todos que se dedicam a estudos sobre o Cerrado”

Dedico

“Esta terra dá de tudo que se possa imaginar: Sapoti, jabuticaba, MANGABA, maracujá, Cajá-manga, murici, Cana-caiana, juá, Graviola, umbu, pitomba, Araticum, araçá.”

“Tem uns pés de marmelada, depois que passa a pinguela. Subindo pro cerradinho,
MANGABA e mama-cadela.”

“Cajuzinho quem quiser é só ir buscar na serra e não tem nada mais doce que araçá dessa terra. Manga, MANGABA, jatobá, bacupari, gravatá e araticum, olha o tempo do pequi.”

(Trechos de composições de autores Goianos: Jurandy da Feira, Genésio Tocantins e Hamilton Carneiro).

Ofereço

“Aos que nasceram familiares
E aos que se tornaram familiares

Aos que me deixam louca
E aos que eu enlouqueço.

Aos que me criticam em tudo
E aos que concordam com tudo (ou quase tudo).

Aos que correm
E aos que contemplam.

Aos que me consideram muito
E aos que nem se importam muito com o que eu penso.

Aos que passam o dia todo comigo,
E aos que estão o tempo todo em mim.

Aos que conhecem somente o que eu faço
Aos que sabem exatamente quem sou.”

AGRADECIMENTOS

* * *

A Deus pela oportunidade da vida e do aprendizado, pela demonstração de sua existência em todos os momentos, tanto de felicidade quanto de inquietação e, principalmente por ter me dado perseverança de não desistir nunca.

* * *

Em um curso de Pós-Graduação, se aprende muitas técnicas para a qualificação profissional. Mas, o que eu aprendi foi muito além. E, considerando esta tese como resultado de uma caminhada que não começou na UFG, agradecer não é tarefa fácil, nem justa. Para não correr o risco da injustiça, agradeço de antemão a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje. A vocês devo todo meu respeito e carinho. Porém, algumas pessoas exerceram papel fundamental nessa jornada. Pessoas que contribuíram diretamente tanto para minha formação profissional, quanto para meu equilíbrio emocional nesses últimos anos. Assim, não posso deixar de fazer alguns agradecimentos especiais:

* * *

Aos órgãos financiadores desse projeto: Prodetab - Embrapa e CNPq.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UFG. Aproveito a oportunidade também para agradecer imensamente aos professores que compõem o quadro docente do curso pelos ensinamentos e aos funcionários da Escola de Agronomia pela dedicação ao trabalho.

Agradeço ainda a Universidade Estadual de Goiás pelo incentivo para o desenvolvimento desse trabalho.

* * *

Ao Dr. **Lázaro José Chaves**, meu orientador, meu “ídolo”. Sua humildade e competência são fontes constantes de inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos. Obrigada pela oportunidade de realizar um trabalho tão maravilhoso. "**O professor medíocre conta. O bom professor explica. O professor superior demonstra. O grande professor inspira.**" (William Arthur Ward).

A Dra. **Ana Y. Ciampi** pela co-orientação e por disponibilizar os laboratórios da EMBRAPA-CENARGEN para o desenvolvimento de uma das etapas desse trabalho. Ao Dr. **Alexandre Siqueira Guedes Coelho** pela co-orientação, pelo olhar crítico e sugestões essenciais no desenvolvimento desse trabalho. Ao Dr. **Sérgio Tadeu Sibov**, das broncas aos conselhos, obrigada por tudo.

* * *

Aos meus amados e eternos “filhotes” (**Isabela, Renata, Edivaldo, Carlos e Karla**). Não sei se um dia serei capaz de retribuir tudo o que fizeram por mim. Com certeza assistirei com todo orgulho os grandes vãos que alcançarão. Agradeço ainda aos estagiários que ao longo desses anos estiveram de alguma forma envolvidos em etapas desse trabalho: **Pollyanna, Eduardo, Hayelle, Diego, Sheila e Perla**.

* * *

Aos companheiros do curso de doutorado e do laboratório **Nara, Keyla, Mansuemia, Carol, Natália, Gisele, Luice, Márcia Nara, Aracelle, Marlei, Elitânia, Carrerinha, Medina, Fernanda, Fernanda Luz**. Em especial agradeço **Fábio Luis Teles, Rita Maria Devós Ganga, Ludmila Bandeira e Tânia Maria de Moura**.

* * *

Sou grata aos integrantes do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa/CNPAF, nas pessoas da **Dra. Rosana P. V. Brondani** e **Dr. Cláudio Brondani**. Em especial agradeço

IMENSAMENTE a **Dra. Tereza Cristina de O. Borba** pela ajuda na otimização dos microssatélites e nas análises estatísticas.

Ao laboratório de Genética & Biodiversidade em especial a **Dra. Mariana Pires de Campos Telles** por sempre se mostrar disponível em ajudar e por me socorrer várias vezes. Agradeço ainda imensamente a **Dra. Thannya Nascimento Soares** pela valiosa atenção, auxílio e sugestões nas análises estatísticas.

* * *

À minha amada **família, meu suporte de todas as horas:**

“Bem, esse tópico dos agradecimentos tive que reescrever pois muita coisa mudou nesse intervalo de tempo entre a defesa da tese e a entrega da versão final. Foram altos e baixos ao longo desse caminho. É vida que se renova, é vida que se segue...”

Agradeço ao meu querido amor **Marco Antônio**. Você chegou logo após a conclusão dessa etapa, mas foi fundamental em minha vida nesses últimos anos. Obrigada por além de ser meu marido, ser meu grande amigo!

A você, querida mãezinha **Tereza**, agradeço pelos ensinamentos de toda uma vida. Você não está mais aqui, mas me sinto agradecida por Deus ter permitido que presenciasses esta etapa importante da minha vida. A saudade é grande, mas o amor será eterno.

Ao meu pai **David**, a minha irmã **Flávia**, ao meu irmão **André** e minha cunhada **Débora**, pelo apoio constante e parceria de uma vida. Em especial, agradeço ao meu sobrinho **Bernardo**, por ser luz em nossas vidas.

À minha afilhada **Carlinha** e aos meus padrinhos **Maria Pereira, Olivar**, pelo convívio, pelo apoio e pelo carinho.

Agradeço ainda aqueles que se tornaram família: à minha sogra (e querida amiga) **Cléris** e seu esposo **Paulo** que, juntamente com meu cunhado **Marcel** (e aqui incluo minha concunhada **Thais** e sua mãe **Leila**), me acolheram como família.

("Os momentos mais felizes da minha vida foram aqueles, poucos, que pude passarem minha casa, com a minha família." - Thomas Jefferson)

* * *

Aqueles que são essenciais na minha vida, **meus amigos**. Não irei enumerá-los para não correr o risco de esquecer alguém... “Mesmo que as pessoas mudem e suas vidas se reorganizem, os amigos devem ser amigos para sempre, mesmo que não tenham nada em comum, somente compartilhar as mesmas recordações.” Vinícius de Moraes.

* * *

Aos meus alunos, motivo maior da minha qualificação profissional.

* * *

Enfim, a todos aqueles que de forma direta ou indireta, contribuíram para realização desse trabalho. Minha gratidão e reconhecimento. **Essa tese é a soma de todos vocês.**

* * *

... E foi assim que eu aprendi a aprender...

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS -----	11
	LISTA DE TABELAS -----	14
	LISTA DE ANEXOS -----	15
	RESUMO GERAL -----	16
	GENERAL ABSTRACT -----	17
1	INTRODUÇÃO -----	18
2.	REVISÃO DE LITERATURA -----	21
2.1	O BIOMA CERRADO-----	21
2.1.1	Aspectos gerais-----	21
2.1.2	Fitofisionomias do Cerrado-----	24
2.1.3	Ocupação do Cerrado-----	25
2.2	ESPÉCIES FRUTÍFERAS DO CERRADO-----	28
2.3	A MANGABEIRA-----	29
2.3.1	Taxonomia e nomenclatura-----	29
2.3.2	Ocorrência e distribuição natural-----	30
2.3.3	Fenologia e Morfologia-----	31
2.3.3	Utilidades-----	39
2.3.4	Germinação e desenvolvimento inicial-----	40
2.3.5	Implicações para o melhoramento genético e conservação-----	41
2.4	ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE PLANTAS-----	43
2.5	MARCADORES MOLECULARES-----	48
2.5.1	Aspectos gerais-----	48
2.5.2	Marcadores de DNA-----	49
2.5.3	Marcadores microssatélites -----	50
3	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES PARA A ESPÉCIE <i>Hancornia speciosa</i> Gomes (Apocynaceae). -----	57
	RESUMO-----	57
	ABSTRACT-----	57
3.1	INTRODUÇÃO-----	58
3.2	MATERIAL E MÉTODOS-----	59
3.2.1.	Material vegetal e extração de DNA -----	59

3.2.2	Desenvolvimento e Caracterização de Marcadores Microsatélites-----	60
3.2.2.1	Construção de biblioteca genômica enriquecida com microsatélites-----	60
3.2.2.2	Sequenciamento de clones positivos, análise das sequências e desenho dos iniciadores-----	64
3.2.2.3	Otimização das condições de amplificação para os iniciadores construídos a partir da biblioteca enriquecida com microsatélites-----	66
3.2.3	Análise estatística-----	69
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	69
3.3.1	Eficiência da biblioteca genômica enriquecida, sequenciamento de clones positivos e desenho dos iniciadores-----	70
3.3.2	Caracterização dos iniciadores construídos a partir da biblioteca <i>TspI</i>---	73
3.4	CONCLUSÕES-----	77
4-	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>Hancornia speciosa</i> Gomes (Apocynaceae) -----	78
	RESUMO-----	78
	ABSTRACT-----	78
4.1	INTRODUÇÃO -----	79
4.2	MATERIAL E MÉTODOS-----	80
4.2.1	Material vegetal -----	81
4.2.2	Extração de DNA-----	85
4.2.3	Condições de amplificação -----	88
4.2.4	Metodologia de análise estatística dos dados-----	88
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	89
4.3.1	Parâmetros genéticos-----	89
4.3.2	Estrutura genética interpopulacional-----	91
4.3.3	Estrutura genética entre variedades botânicas -----	96
4.4	CONCLUSÕES-----	99
5	CONCLUSÕES GERAIS-----	100
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	101
7	ANEXOS-----	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1.	Distribuição dos biomas continentais brasileiros com destaque para o Cerrado. A) Distribuição dos seis biomas continentais brasileiros: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa. B) Destaque para a distribuição da vegetação do bioma Cerrado. Fonte: IBGE, 2004; Embrapa, 2007. -----	22
Figura 2.2	Esquema adaptado das principais fitofisionomias do bioma Cerrado, segundo Ribeiro & Walter (1998). Fonte: Ribeiro & Walter (2001) <i>In</i> : Soares (2009)-----	25
Figura 2.3	A: Mapa resultante da classificação das imagens de satélite do sensor MODIS (Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer) que indica as áreas originais e desmatadas na parte central do Cerrado e os principais blocos remanescentes de vegetação nativa. B: Distribuição espacial das classes de uso da terra no Bioma Cerrado no ano de 2002. Fonte: Machado et al. (2004); Sano et al. (2008). -----	26
Figura 2.4	Centro de diversidade de espécies fúíferas do Brasil. 1) Alto Noroeste/Rio Negro; 2) Costa Atlântica e Baixo Amazonas; 3) Roraima/Manaus; 4) Oeste do Amazonas/Solimões; 5) Sudoeste Acre/Rondônia; 6) Centro Nordeste/Caatinga; 7) Sul-Sudeste; 8) Brasil Central/Cerrado; 9) Mata Atlântica (9A: Nordeste – da costa do Rio Grande do Norte e alagoas, 9B: Bahia/ Espírito Santo/ Vale do Rio Doce – do litoral de Sergipe ao Espírito Santo;); 10) Brasil (Mato Grosso e Mato Grosso do sul)/Paraguai. Os principais centros de diversidade genética associados a mangabeira são: Centro 2, 6, 8, 9A e 9B. Fonte: Giacometti (1993), <i>In</i> : Silva Junior et al. (2006).-----	31
Figura 2.5	Planta adulta de mangabeira. Foto: Lázaro José Chaves (2008).-----	31
Figura 2.6	Progênies de mangabeira pertencentes ao banco de germoplasma da Universidade Federal de Goiás e representam as variedades botânicas H.s. var <i>pubescens</i> , H.s. var <i>cuyabensis</i> , H.s. var <i>gardneri</i> e H.s. var <i>speciosa</i> . Destaque para as folhas de mangabeiras e microestrutura foliar de mangabeiras. Foto: Lázaro José Chaves (2008), Rita Devós Ganga (2008) e Túlio Carmo (2009).-----	33
Figura 2.7	Flores de mangabeira. Foto: Lázaro José Chaves (2008).-----	35
Figura 2.8	Frutos de mangabeiras. Foto: Lázaro José Chaves (2008).-----	38
Figura 2.9	Representação do <i>slippage</i> , ou o deslizamento da polimerase, principal mecanismo relacionado ao surgimento e amplificação dos microssatélites nos genomas.-----	52
Figura 2.10	Representação esquemática da especificidade dos iniciadores desenhados a partir dos microssatélites- a seqüências únicas dos microssatélites servem como molde para a síntese de oligonucleotídeos (iniciadores). -----	53
Figura 2.11	Principais etapas envolvidas na construção de iniciadores microssatélites, a partir de bibliotecas enriquecidas.-----	54
Figura 3.1	Etapas do processo de extração de DNA. A) Coleta e armazenamento de folhas. Limpeza e liofilização das folhas na presença de nitrogênio líquido em cadinho de porcelana. Acréscimo de tampão de extração ao macerado e submissão das amostras ao banho-maria. B) Desproteínização com CIA, seguido de lavagem com sal. C) Lavagem	

	com etanol 70% (2X), seguido da lavagem com etanol absoluto (1X). Fonte: Almeida Júnior (2008). -----	60
Figura 3.2	Digestão do DNA genômico com enzimas de restrição e ligação dos fragmentos digeridos a adaptadores.-----	61
Figura 3.3	Etapas do enriquecimento (A) e reenriquecimento (B) da biblioteca genômica por meio de sondas biotiniladas, recuperação dos fragmentos com contas magnéticas (<i>beads</i>), Amplificação dos fragmentos enriquecidos.-----	63
Figura 3.4	Esquema da ligação do DNA purificado, ao vetor pGEM-T <i>Easy Vector</i> (<i>Promega Corp</i>) e identificação dos clones positivos.-----	64
Figura 3.5	Amplificação e sequenciamento dos clones positivos e desenho dos iniciadores. A: repicagem, amplificação e purificação dos clones positivos. B: sequenciamento dos clones positivos e desenho dos iniciadores.-----	66
Figura 3.6	Mapa das localidades de coleta das matrizes de mangabeira do Cerrado representadas na coleção da EA/UFG.-----	69
Figura 3.7	Eficiência da digestão com a enzima <i>TspI509</i> ; controle do enriquecimento e seleção de fragmentos para seqüenciamento. A) Digestão com a enzima <i>TspI509</i> - fragmentos gerados (200-800 pb). B) Visualização após a recuperação dos fragmentos. C: Resultado da reação de amplificação dos produtos obtidos na etapa de reenriquecimento com os sete tubos das lavagens. D: quantificação da reação de amplificação - pré-reação de sequenciamento. As setas indicam Marcadores de peso molecular. Gel de agarose a 2%.-----	70
Figura 3.8	Motivos microssatélites encontrados nas 74 seqüências de iniciadores desenhados a partir da biblioteca <i>TspI</i> . A) Frequência dos motivos quanto ao número de unidades que se repetem. B) Frequência dos tipos de motivos. -----	73
Figura 3.9	Perfil dos fragmentos gerados a partir das reações de amplificação via PCR, com o iniciador HS26, com 35 indivíduos. Acrilamida 6%, corado com prata. -----	74
Figura 3.10	Variação da temperatura de anelamento específica obtida a partir da amplificação dos 35 iniciadores otimizados. -----	75
Figura 4.1	Localidades de coleta das subpopulações de mangabeira do Cerrado representadas na coleção da EA/UFG. -----	84
Figura 4.2	Etapas do processo de extração de DNA, A) Coleta e armazenamento de folhas, Limpeza e liofilização das folhas na presença de nitrogênio líquido em cadinho de porcelana, Acréscimo de tampão de extração ao macerado e submissão das amostras ao banho-maria; B) Desproteínização com CIA, seguido de lavagem com sal; C) Lavagem com etanol 70% (2X), seguido da lavagem com etanol absoluto (1X), Fonte: Almeida Júnior (2008). -----	86
Figura 4.3	Perfil dos fragmentos gerados a partir das reações de PCR, com o iniciador HS01, com 155 genótipos, aplicado em sistema multiplex. Poliacrilamida 6%, corado com prata. -----	87
Figura 4.4	Dendrograma para melhor visualização da diversidade genética a partir do método UPGMA.-----	94
Figura 4.5	Análise de coordenadas principais (PCA) (três dimensões) realizada	

- sobre a matriz de distâncias genéticas de Nei (1972) entre 32 populações de *H. speciosa*, a partir de dados microssatélites. 1 (Barro Alto – GO), 2 (Campinorte – GO), 3 (Porangatu – GO), 4 (Jalapão – TO), 5 (Mateiro – TO), 6 (Dianópolis – TO), 7 (São Desidério – BA), 8 (Alvorada do Norte – GO), 9 (Alexânia – GO), 10 (Matrinchã – GO), 11 (Goiás – GO), 12 (Silvânia – GO), 13 (Luziânia – GO), 14 (Goiânia – GO), 15 (Pirenópolis – GO), 16 (Piranhas – GO), 17 (Barra do Garças – MT), 18 (General Carneiro – MT), 19 (Chapada dos Guimarães – MT), 20 (Rondonópolis- MT), 21 (Sonora – MS), 22 (Coxim – MS), 23 (Costa Rica – MS), 24 (Alcinópolis – MS), 25 (Chapadão do Sul – MS), 26 (Caçu – GO), 27 (Niquelândia – GO), 28 (Posse – GO), 29 (Ponte Alta – TO), 30 (Orizona – GO), 31 (Japonvar – MG), 32 (Araguapaz).----- 95
- Figura 4.6** Relação existente entre as distâncias geográficas e as distâncias genéticas de Nei (1972) entre as 32 populações de *H. speciosa*, calculadas a partir de seis locos microssatélites genômicos.----- 96
- Figura 4.7** Dendrograma construído a partir da análise de seis locos microssatélites de *H. speciosa*, considerando como distância genética o valor da estimativa de N_{ST} par a par entre as variedades botânicas.----- 99

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Diferenças morfológicas entre as variedades botânicas de <i>H. speciosa</i> Gomes. -----	34
Tabela 3.1	Localidades de coleta, coordenadas geográficas e variedades das plantas de mangabeira da coleção da EA/UFG, utilizadas para caracterização dos locos microssatélites. Latitude (S), Longitude (O), Altitude (m) . -----	68
Tabela 3.2	Relação das 74 sequencias obtidas a partir da biblioteca enriquecida com microssatélites para espécie <i>Hancornia speciosa</i> .-----	71
Tabela 3.3	Relação dos 35 pares de iniciadores sintetizado e caracterizados para espécie <i>Hancornia speciosa</i> .-----	76
Tabela 4.1	Localidades, coordenadas geográficas e variedades das matrizes de mangabeira do Cerrado representadas na coleção da EA/UFG (Anexos B), em função do município de coleta.-----	81
Tabela 4.2:	Localidades, coordenadas geográficas e variedades das matrizes de mangabeira do Cerrado representadas na coleção da EA/UFG (Anexos B), em função da variedade botânica.-----	83
Tabela 4.3:	Seqüências dos pares de iniciadores desenvolvidos para <i>H. speciosa</i> que amplificaram locos microssatélites. -----	87
Tabela 4.4	Parâmetros de diversidade genética estimados com base nos locos de toda a população, variedades botânicas e áreas geográficas de populações naturais de <i>H speciosa</i> . n: número de indivíduos. A: número médio de alelos por loco; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigozidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg; f: índice de fixação intrapopulacional.-----	90
Tabela 4.5	Estimativa dos parâmetros indicadores do grau de estruturação genética em naturais de mangabeira (<i>H. speciosa</i>) com dados de seis locos microssatélites, 32 áreas geográficas.-----	92
	-	
Tabela 4.6	Estimativa dos parâmetros indicadores do grau de estruturação genética em populações naturais de mangabeira (<i>H. speciosa</i>) com dados de seis locos microssatélites, a partir da diferença entre as variedades botânicas.	98
Tabela 4.7	Estimativa dos parâmetros indicadores do grau de estruturação genética em populações naturais de mangabeira (<i>H. speciosa</i>) com dados de seis locos microssatélites, a partir da diferença entre as variedades botânicas sob o modelo de modelo <i>stepwise</i> , par a par.-----	99

LISTA DE ANEXOS

- Anexo A** Croqui da coleção de frutíferas nativas do Cerrado da EA/UFG. Sementes provenientes de 109 matrizes de 35 regiões do Cerrado brasileiro (Goiás, Tocantis, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Bahia) foram utilizadas na implantação da coleção de germoplasma da espécie na EA/UFG em dezembro de 2005. O delineamento experimental usado foi o de blocos completos casualizados com 57 tratamentos, quatro repetições e uma planta por parcela no espaçamento de 5 m x 6m. Os tratamentos foram construídos por progênie de polinização livre, e que abrangeu quatro variedades botânicas: *pubescens*, *gardineri*, *speciosa* e *cuyabensis* (Ganga, 2008).----- 111

RESUMO GERAL

RODRIGUES, A. J. L. **DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES E ESTRUTURA GENÉTICA DE *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae)**. 2009. 113f. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, 2008.¹

O objetivo deste trabalho foi construir iniciadores a partir do desenvolvimento de bibliotecas enriquecidas com locos microssatélites e avaliar a magnitude e a distribuição espacial da variabilidade genética em populações naturais de *H. speciosa* do Cerrado. Foram isolados e sequenciados locos que continham regiões microssatélites, o que resultou no desenho de 74 pares de iniciadores. Destes, 35 foram selecionados para síntese e otimização da amplificação via PCR. Todos os iniciadores sintetizados amplificaram, com temperatura de anelamento que variou de 48°C a 64°C. Os iniciadores foram testados em 35 genótipos de mangabeira originários de diferentes áreas geográficas. Os 35 indivíduos também foram agrupados em quatro populações de acordo com a variedade botânica que pertencem (*H. s.* var. *speciosa*, *H. s.* var. *cuyabensis*, *H. s.* var. *gardneri*, *H. s.* var. *pubescens*). Foram selecionados seis pares de iniciadores para análise de 162 progênies pertencentes à coleção de germoplasma da EA/UFG. Os marcadores desenvolvidos foram considerados altamente informativos, com alto índice de polimorfismo e representam uma ferramenta adequada para ser utilizada em estudos de estrutura genética de populações naturais. Foi observado um elevado número de alelos por loco. As progênies avaliadas apresentaram alto índice de polimorfismo. O valor obtido para H_e foi alto, o que é um indicativo de diversidade genética elevada. O valor obtido para o índice de fixação (f) foi positivo e elevado e sugere uma taxa relativamente alta de endogamia nas populações estudadas. O valor estimado de F_{ST} , considerando-se cada área geográfica como uma subpopulação, foi de 0,19. Este parâmetro é um indicativo da divergência genética entre as subpopulações, o que sugere um alto nível de diferenciação e corrobora a hipótese de restrição ao fluxo gênico. A estimativa do parâmetro N_{ST} , análogo ao F_{ST} , porém considerando o tamanho dos alelos, forneceu um valor consideravelmente maior, o que reforça a grande diversidade existente entre as subpopulações de mangabeira do Cerrado. Foi observado também o Nei o agrupamento das populações de maneira aleatória, independente da distância geográfica, o que indica que não há estruturação no espaço geográfico da variabilidade genética entre as populações. Foi observada uma ausência de correlação entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas o que confirma, para esse estudo, a distribuição aleatória dos genótipos, reforçando a hipótese de restrição ao fluxo gênico, mesmo a curtas distâncias. Ao considerar as variedades botânicas como diferentes populações, observou-se uma estimativa de 0,0583 para a estatística F_{ST} e o valor estimado de N_{ST} foi de 0,1738 o que mais uma vez indica, a maior sensibilidade deste parâmetro para detectar divergência entre populações. Foi realizada uma análise de estrutura genética par a par entre as variedades botânicas e a partir das distâncias genéticas obtidas, medidas pelo parâmetro N_{ST} , foi possível observar uma maior semelhança entre *H. s.* var. *gardneri* e *H. s.* var. *pubescens* o que era esperado pelo fato de apresentarem uma simpatria em sua ocorrência. A variedade *H. s.* var. *cuyabensis* mostrou-se a mais divergente em relação às demais. O fato de a população de Japonvar-MG não ter se agrupado com *H. s.* var. *speciosa*, corrobora a hipótese de esta pertencer a outra variedade botânica, o que deve ser melhor investigado.

Palavras-Chave: Mangaba, MICROSSATÉLITE, estrutura genética, Cerrado.

¹ Orientador: Dr. Lázaro J. Chaves, EA-UFG; Co-orientação: Dra. Ana Y. Ciampi, EMBRAPA-CENARGEN e Dr. Alexandre S. G. Coelho, EA-UFG.

GENERAL ABSTRACT

RODRIGUES, A. J. L. **Development and characterization of microsatellite markers and genetic structure of natural populations of *Hancornia speciosa* Gomes** (Apocynaceae) 2009. 112f. thesis (Doctorate in Agronomy: Genetic and plant breeding) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, 2008. ¹

The objective of this work was to construct primers from the development of libraries enriched with microsatellite loci and to evaluate the magnitude and spatial distribution of genetic variability in natural populations of *H. speciosa* do Cerrado. Locals containing microsatellite regions were isolated and sequenced, which resulted in the design of 74 primer pairs. Of these, 35 were selected for synthesis and optimization of PCR amplification. All the synthesized primers amplified, with annealing temperature ranging from 48° C to 64° C. The primers were tested on 35 genotypes of mangabeira originating from different geographic areas. The 35 individuals were also grouped into four populations according to the botanical variety they belong to (*H. s. Var. Speciosa*, *H. s.var. cuyabensis*, *H. s.var. gardneri*, *H. s.var. pubescens*). Six pairs of primers were selected for analysis of 162 progenies belonging to the EA / UFG germplasm collection. The developed markers were considered highly informative, with high index of polymorphism and represent a suitable tool to be used in genetic structure studies of natural populations. A high number of alleles per locus were observed. The progenies evaluated had a high polymorphism index. The value obtained for 'He' was high, which is indicative of high genetic diversity. The value obtained for the fixation index (f) was positive and high and suggests a relatively high rate of inbreeding in the studied populations. The estimated value of FST, considering each geographical area as a subpopulation, was 0.19. This parameter is indicative of the genetic divergence among the subpopulations, which suggests a high level of differentiation and corroborates the hypothesis of restriction to the gene flow. The NST parameter, similar to the FST, but considering the size of the alleles, provided a considerably higher value, which reinforces the great diversity among the subpopulations of the Cerrado mangrove. Nei was also observed to group the populations in a random manner, regardless of the geographic distance, which indicates that there is no structuring in the geographic space of the genetic variability among the populations. An absence of correlation between genetic distances and geographic distances was observed, which confirms the random distribution of genotypes for this study, reinforcing the hypothesis of restriction to gene flow, even at short distances. When considering the botanical varieties as different populations, an estimate of 0.0583 was observed for the FST statistic and the estimated NST was 0.11738, which again indicates the greater sensitivity of this parameter to detect divergence between populations. A genetic structure analysis was carried out in pairs between the botanical varieties and from the genetic distances obtained, measured by the parameter NST, it was possible to observe a greater similarity between *H. s. var. gardneri* and *H. s. var. pubescens* which was expected to be sympatric in its occurrence. The *H. s. var. cuyabensis* was the most divergent in relation to the others. The fact that the population of Japonvar-MG did not cluster with *H. s. var. speciosa*, corroborates the hypothesis that this belongs to another botanical variety, which should be further investigated.

Keywords: Mangaba, MICROSSATÉLITE, genetic structure, Cerrado.

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado é um bioma brasileiro constituído por mosaicos de formações vegetais que variam desde campos abertos até formações densas de florestas (Walter, 1998). Está listado como um dos 25 *hotspots* mundiais para conservação da biodiversidade e as maiores ameaças à sua diversidade decorrem da atividade antrópica (Myers et al., 2000). A expansão da fronteira agrícola substitui áreas contínuas de vegetação natural por monoculturas, reflorestamentos monoespecíficos e pastagens, sem deixar amostras das formações vegetais que possam funcionar como banco genético e refúgio da fauna e flora (Aguiar & Camargo, 2004).

Dentre as várias espécies existentes no bioma Cerrado, as frutíferas destacam-se devido a suas propriedades de exploração comercial. As frutas nativas são fontes nutricionais para as populações de baixa renda. Representam ainda um reforço no orçamento destas famílias em decorrência da comercialização dos frutos para a população local. A vantagem de se utilizarem frutas nativas é que, uma vez que as plantas já estão adaptadas ao clima e solo da região e possuem mercado regional garantido, com possibilidade de expansão (Chaves & Naves, 1999). Nesse contexto, a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), apresenta grande potencial econômico. Por apresentar sabor e aroma característicos, a polpa do fruto é consumida *in natura* ou utilizada como matéria-prima para o preparo de geléias, doces, xaropes, compotas, vinhos, vinagres e principalmente suco e sorvete (Silva Júnior et al., 2006).

A crescente demanda pelos produtos derivados da mangabeira confirma o potencial agro-sócio-econômico de exploração da espécie. No entanto, há necessidade de pesquisas para solucionar os problemas tecnológicos que impossibilitam a exploração comercial dessa fruteira. Métodos de propagação, porte da árvore, forma de colheita, manejo, sistemas de plantio, são algumas das barreiras que dificultam a implantação de pomares comerciais, e para tanto, existe a necessidade de estudos para a caracterização da espécie e conseqüente seleção de genótipos de interesse econômico. Além disso, esta cultura é explorada de forma extrativista, o que pode resultar em acelerado processo de erosão genética (Pinheiro et al., 2001; Lederman & Bezerra, 2006).

Inicialmente, os estudos genéticos de plantas eram baseados em características morfológicas de fácil identificação visual. Apesar de contribuírem para estudos populacionais e de melhoramento, esses marcadores sofrem grande efeito ambiental. Os marcadores de DNA, por sua vez, são independentes das condições ambientais e revelam alto nível de polimorfismo, além de serem abundantes, apresentarem herança mendeliana e possibilitarem uma descrição mais detalhada da estrutura genética de populações (Ferreira & Gratapaglia, 1998; Faleiro, 2007).

Vários fatores estão envolvidos na escolha de um marcador. Técnicas que fazem uso da PCR (*Polimerase Chain Reaction* ou Reação da polimerase em Cadeia) aceleraram o desenvolvimento de novos sistemas para obtenção de marcadores de DNA, tal como os microssatélites, seqüências curtas de nucleotídeos repetidas na mesma ordem. Estes marcadores são tipicamente co-dominantes, altamente multialélicos e o nível de polimorfismo produzido é devido à variação no número de unidades de repetição em um determinado loco. Os iniciadores flanqueiam regiões que contêm os microssatélites e são desenhados a partir do sequenciamento de fragmentos de DNA, obtidos de bibliotecas genômicas. Estes marcadores permitem a estimativa da variação dentro e entre populações (Goldstein & Schlotterer, 1999). Apesar dos significativos avanços obtidos nos últimos anos, ainda não estão publicamente disponíveis marcadores microssatélites para a maioria das espécies vegetais, como é o caso da espécie *H. speciosa*.

Embora não conste em nenhuma lista de extinção, a mangabeira apresenta o seu germoplasma ameaçado em diversas áreas. Apesar da grande variabilidade genética relacionada à espécie, acredita-se que germoplasma de interesse já foi perdido sem que, ao menos, fosse registrada sua ocorrência (Chaves, 2006; Silva Júnior et al., 2006). Alguns autores já confirmaram essa variabilidade genética ao realizarem estudos com a espécie com o uso de marcadores morfológicos e marcadores moleculares RAPD e cpDNA como por exemplo, Almeida et al. (2003); Silva, (2006); Moura (2003), Moura et al. (2005); Capinan (2007); Silva Junior et al. (2007); Ganga (2008).

Assim, ao considerar as limitações dos marcadores já utilizados com a mangabeira, e ainda, as vantagens dos marcadores microssatélites esse trabalho visou o desenvolvimento de marcadores moleculares microssatélites e o estudo da estrutura genética de populações naturais de *Hancornia speciosa* Gomes. Os objetivos específicos foram:

- i. Isolar e sequenciar locos que contenham regiões microssatélites;

- ii. Desenhar iniciadores específicos para as regiões flanqueadoras dos microssatélites;
- iii. Otimizar as condições de amplificação para os locos microssatélites isolados a partir de bibliotecas enriquecidas com microssatélites;
- iv. Caracterizar locos microssatélite isolados a partir de bibliotecas enriquecidas quanto ao tipo de repetição, número e tamanho de alelos amplificados, temperatura de anelamento, heterozigosidade observada e esperada em *Hancornia speciosa* Gomes;
- v. Verificar se as populações se encontram em conformidade com o princípio de EHW e estimar a estrutura genética de populações naturais de *Hancornia speciosa* Gomes
- vi. Avaliar a estrutura genética entre as variedades *H. speciosa* var. *speciosa*, *H. speciosa* var. *cuyabensis* Malme, *H. speciosa* var. *gardneri* (A. DC.) Muell. Arg., *H. speciosa* var. *pubescens* (Nees. et Martius) Muell. Arg.;
- vii. Estabelecer grupos de similaridade e divergência genética entre os indivíduos analisados;
- viii. Estabelecer possíveis correlações de variabilidade genética da espécie com a distribuição geográfica;
- ix. Inferir sobre o fluxo gênico entre subpopulações e entre variedades botânicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O BIOMA CERRADO

2.1.1 Aspectos gerais

O Brasil é considerado como um dos países de maior biodiversidade no mundo, pois se calcula que cerca de 10% de toda a biota terrestre encontram-se no país (Mittermeier et al. 1997). Os primeiros registros de estudos da vegetação brasileira datam do Século XVII, com a viagem dos naturalistas holandeses Pizo e Marcgraf, durante uma missão científica (Caldeiron, 1992). A biodiversidade existente no país é distribuída em seis variedades de vegetação: Floresta Amazônica, ao norte do país; Caatinga, predominante na região nordeste; Floresta atlântica, que cobre áreas de norte a sul do Brasil, com predominância no sistema costeiro; Pantanal, o qual ocorre preferencialmente em paisagens de declividade praticamente nula; Campos e Florestas Meridionais, que ocorrem na região sul e Cerrado, que predomina no Brasil Central (Pinto, 1993).

O segundo maior bioma brasileiro é o Cerrado (palavra de origem espanhola que significa fechado), caracterizado por um mosaico de formações vegetais que variam desde campos abertos até formações densas de florestas que podem atingir até 30 metros de altura (Eiten 1972, 1994; Ribeiro & Walter, 1998). O bioma ocorre principalmente no Planalto Central do País, localizado entre 5° e 20° de latitude Sul e 45° e 60° de longitude oeste. Abrange o território do Distrito Federal e ocorre ainda nos Estados de Tocantins, parte da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Goiás, Rondônia e São Paulo. Também tem presença nos estados do Amapá, Amazonas, Pará e Roraima, representados por áreas disjuntas, e ao sul do país, em pequenas regiões no Paraná. Fora do Brasil ocupa áreas na Bolívia e Paraguai, enquanto paisagens semelhantes são encontradas na Colômbia, Guiana, Suriname e Venezuela, onde recebem outras denominações (Figura 2.1). A extensão original do ecossistema, que inclui as regiões definidas como "área de contato" entre Cerrado e outros tipos de vegetação, chegaria a 2,2

milhões de km², o que corresponderia a 25% do território brasileiro. O Estado de Goiás possui 341.289.50 km² de seu território coberto por essa vegetação, que corresponde a quase 100% de sua área total (Pinto, 1993; Aguiar & Camargo, 2004).

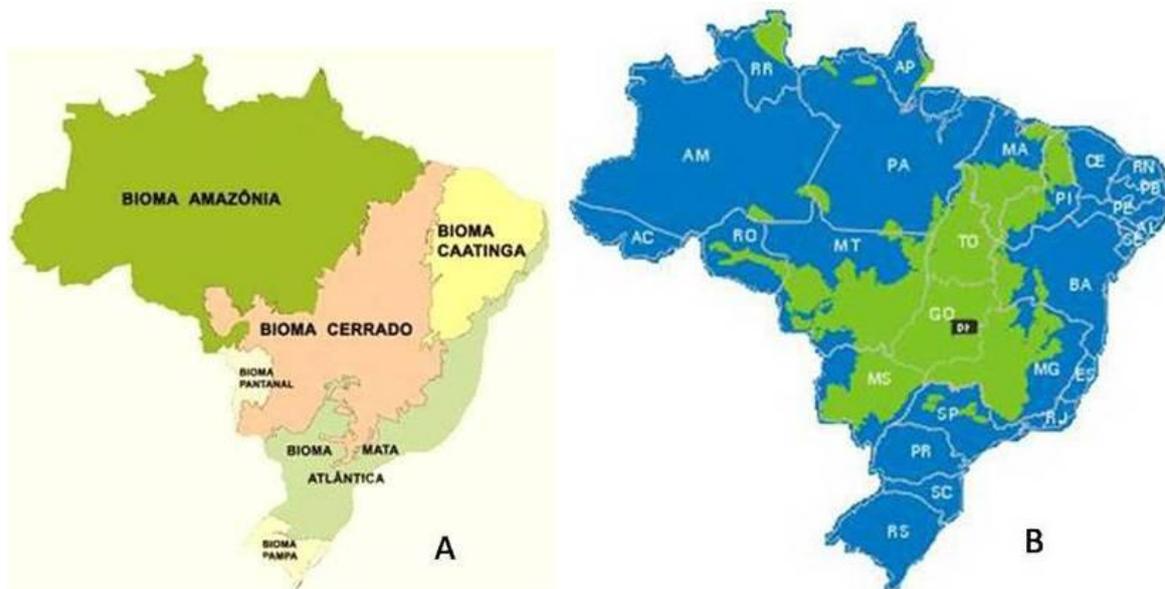


Figura 2.1. Distribuição dos biomas continentais brasileiros com destaque para o Cerrado. A) Distribuição dos seis biomas continentais brasileiros: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa. B) Destaque para a distribuição da vegetação do bioma Cerrado. Fonte: IBGE, 2004; Embrapa, 2007.

Inúmeras teorias surgiram na tentativa de explicar a origem das características intrínsecas da vegetação do Cerrado. Há relatos de que existiu um protótipo do bioma no Cretáceo, antes da separação dos continentes da África e América do Sul. No início do século XX a estacionalidade climática, a ocorrência do fogo e as condições do solo foram descritos como fatores determinantes. No final dos anos de 1950 surgiu a proposta do oligotrofismo distrófico, em que a deficiência do solo em nutrientes minerais e a alta concentração de alumínio, levariam as espécies a acumularem açúcares e gorduras em suas folhas. Atualmente admite-se que a combinação da estacionalidade climática, os tipos de solos e a ocorrência do fogo contribuíram para a formação da vegetação do bioma (Pinto, 1993; Alho & Martins, 1995).

A ocupação do Cerrado teve início há 11 milênios, com caçadores e coletores. No início do século XVIII houve uma ocupação mais efetiva pelo homem branco, com a exploração de ouro e pedras preciosas. Com a exaustão das minas, a região passou a desenvolver uma criação extensiva de gado. Acredita-se que as populações primitivas foram obrigadas a buscar novas estratégias de sobrevivência, baseada na coleta de frutos

nativos e na criação de animais de pequeno porte. A partir dos anos de 1950, com a construção de Brasília e a adoção de estratégias políticas de desenvolvimento e investimentos em infra-estrutura, o Cerrado converteu-se na fronteira agrícola do país. A agricultura intensiva permitiu maior utilização do espaço físico, o que acarretou no aumento da população regional (Pinto, 1993; Alho & Martins, 1995)

O clima do Cerrado é predominantemente tropical. Podem ocorrer geadas leves em noites de inverno em regiões com altitudes mais elevadas, como nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. As temperaturas médias no Cerrado variam em torno 27°C ao norte e 22°C ao sul. A vegetação recebe entre 1.000 mm e 2.000 mm de chuva por ano, embora a precipitação média anual seja de 1.500 mm. O regime de chuvas é marcante com um período seco, de abril até setembro, e outro chuvoso, que se inicia em outubro, com precipitações mais intensas entre os meses de novembro a março. As precipitações durante o período chuvoso podem ocorrer de maneira irregular, há dias de chuva intensa intercalados com períodos curtos de estiagem. As estações seca e chuvosa provocam alterações na cobertura florística. A maior queda de folhas ocorre nos meses de menores taxas pluviométricas, enquanto que o surgimento de novas folhas, floração e frutificação ocorrem no início do período chuvoso (Barros & Caldas, 1980; Rizzo, 1981; Pinto, 1993).

A ocorrência do fogo na região do Cerrado é antiga; pode surgir espontaneamente, provocado por agentes de combustão natural, por descargas elétricas ou ainda por interferência do homem, principalmente em regiões de pecuária extensiva. O fogo é um dos determinantes da vegetação, junto com a sazonalidade de chuvas e com o solo pobre em nutrientes. A maioria das plantas parece adaptada a esse fenômeno, visto que, várias espécies apresentam mecanismos específicos de regeneração e de dispersão/reprodução, que permitem sua sobrevivência. A adaptação da vegetação ao fogo está relacionada a vários fatores como o tipo de queimada, o regime de queima e também o comportamento do fogo. Alterações nesses fatores podem resultar em danos severos na estrutura e na dinâmica da vegetação (Moreira, 2000; Aguiar & Camargo, 2004).

O Cerrado é uma vegetação de interflúvio, tipicamente sobre latossolos vermelhos ou amarelos, com muito, médio ou pouco conteúdo de argila. Os solos do Cerrado são originados de rochas antigas (arenito, ardósia, folheto, quartzo, quartzito, granito, xisto, micaxisto e certas formas de gnaiss, ou de matéria de solo depositada), com idades que variam de 570 milhões a 4,7 bilhões de anos. Aproximadamente 90% dos solos

são ácidos, com alta concentração de ferro e alumínio. Apresenta ainda deficiência de nutrientes e alta capacidade de fixação de fósforo (Pinto, 1993)

Por ser localizado em áreas altas, o Cerrado abriga a nascente de inúmeros rios e funciona como caixa d'água, pois os principais rios nascem e crescem na região antes de seguirem para as bacias hidrográficas. Essa abundância de recursos hídricos representa extrema importância para a vegetação, uma vez que permite o intercâmbio de sementes, pólen e mesmo a dispersão da fauna pelas matas de galeria que acompanham córregos e rios. Isso possibilita que indivíduos do Cerrado se acasalem com representantes da Amazônia, da Mata atlântica, e da Caatinga, fato que contribui para o aumento da variabilidade genética das espécies (Oliveira- Filho & Lima, 2002).

A biodiversidade do Cerrado é elevada. É a mais diversificada savana tropical do mundo, em relação a habitats e espécies. Apresenta o segundo maior conjunto de animais da terra, o que representa uma riqueza biológica correspondente a 30% da biodiversidade brasileira e 5% da flora e fauna mundiais (Primack & Rodrigues, 2001; Aguiar & Camargo, 2004; Klink & Machado; 2005). Acredita-se que toda essa diversidade esteja associada à uma dinâmica de avanços e recuos de sua vegetação ao longo dos tempos, em que os grandes rearranjos de distribuição e fragmentação das populações permitiram a diversificação das espécies (Eiten, 1993; Gottsberger & Gottsberger, 1998).

Estudos sobre a flora do Cerrado apontam a ocorrência de 193 famílias e 1.521 gêneros. Em um número total de 11.627 espécies nativas detectadas, 385 são pteridófitas, 4 gimnospermas e 11.238 angiospermas. A família Leguminosae tem ocorrência de maior destaque no bioma, representada por 108 Gêneros e 1.174 espécies. São também abundantes a família Asteraceae constituída por 155 Gêneros e 1.074 espécies e Orchidaceae que apresenta 121 Gêneros e 666 espécies. As espécies dessa flora não apresentam comportamento de plantas xerofíticas. Seus estômatos permanecem abertos durante todo o dia, mesmo na seca, em condições de realizar o máximo de fotossíntese, que sugere a existência de grandes reservas de água no solo (Mendonça et al., 2008).

2.1.2 Fitofisionomias do Cerrado

A grande diversidade de animais e plantas do Cerrado está associada à variação de ambientes. Em termos fisionômicos, trata-se predominantemente de uma savana tropical, ou seja, as árvores e arbustos de caule grosso co-existem com espécies rasteiras

principalmente gramíneas. A ocorrência de um dos dois grupos, associados a outras formações vegetais, às mudanças climáticas ou a vários aspectos ambientais, formam as vegetações distintas nesse bioma. São descritos atualmente onze tipos de vegetações do Cerrado, distribuídas em três categorias que compreendem as formações florestais, savânicas e campestres (Figura 2.2).

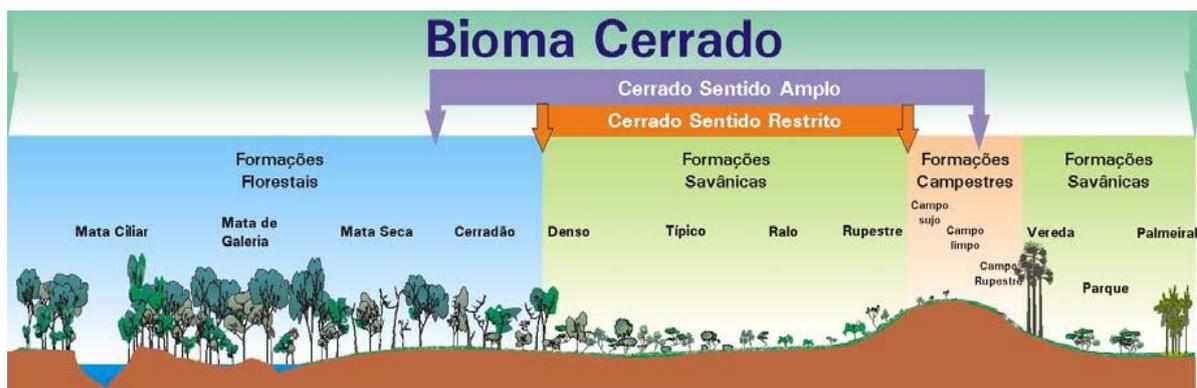


Figura 2.2. Esquema adaptado das principais fitofisionomias do bioma Cerrado, segundo Ribeiro & Walter (1998). Fonte: Ribeiro & Walter (2001) In: Soares (2009).

As Formações Florestais representam as áreas com predominância de espécies arbóreas e formação de dossel, constituídas por quatro grupos distintos: Mata Ciliar, Mata de Galeria, Mata Seca e Cerradão. As formações Savânicas são áreas caracterizadas pela presença de árvores e arbustos espalhados sobre extrato gramíneo, com ausência da formação de dossel contínuo. Essas formações englobam quatro grupos principais: Cerrado sentido restrito, Parque de Cerrado, Palmeiral e Vereda. As Formações campestres são áreas com espécies herbáceas predominantes, presença de algumas espécies arbustivas e raras aparições de árvores de paisagem. Ocorrem nessas formações o Campo Sujo, Rupestre e Limpo. Sua fisionomia mais comum é o Cerrado *sensu stricto*, formação característica que apresenta árvores baixas, inclinadas, tortuosas, com ramificações irregulares, retorcidas e comumente com evidência de queimadas (Pinto, 1993; Chaves & Naves 1998; Sano & Almeida, 1998; Ribeiro & Walter, 2001; Machado et al., 2004).

2.1.3 Ocupação do Cerrado

Com toda essa biodiversidade, o Cerrado é considerado como uma das 25 áreas mais ameaçadas do planeta. Inicialmente acreditava-se que o bioma não possuía capacidade

de produção agrícola que atendesse aos interesses comerciais. No entanto, nas últimas décadas, este cenário mudou. O desenvolvimento da região com a expansão rodoviária, populacional, imobiliária e agropecuária começou a promover a devastação da vegetação nativa, o que comprometeu seriamente a manutenção de várias espécies da flora e fauna. A área já desmatada para o Cerrado até o ano de 2002 era de 54,9% da área original (Figura 2.3) (Myers et al., 2000; Costa, 2004; Machado et al. 2004; Klink & Machado, 2005).

Cerca de 700.000 km² das áreas do Cerrado sofreram ação antrópica. As áreas abertas para introdução de pastagem para a criação de gado de corte e a degradação da vegetação silvestre para a expansão da agricultura, principalmente na forma de monocultura, representou a principal causa de desmatamento (Naves, 1999). Essa transformação da agricultura brasileira aconteceu a partir dos anos de 1960, proveniente da interiorização do país pelo governo. Nessa ocasião o Cerrado tornou-se estratégico na incorporação de novas áreas, devido às suas características físico-químicas e geográficas, que possibilitaram a expansão agropecuária nos moldes da “Revolução Verde”. Porém, na visão de agricultores e técnicos, vindos de outras regiões, o bioma era pobre em recursos vegetais e, portanto, a substituição de vegetação nativa por espécies cultivadas não traria nenhuma perda em termos de recursos naturais. Junto com os benefícios vieram os problemas tanto de ordem ambiental e econômico, quanto social. Centenas de milhares de hectares de Cerrado nativo foram desmatados para dar lugar a lavouras e pastagens e sua vegetação se transformou em carvão para suprir as indústrias siderúrgicas da Região Sudeste do país. Somente nos últimos anos é que passou a ser dada atenção aos problemas decorrentes do desmatamento indiscriminado que refletiu principalmente na erosão genética e conseqüente perda de diversidade (Chaves, 2001, 2006).

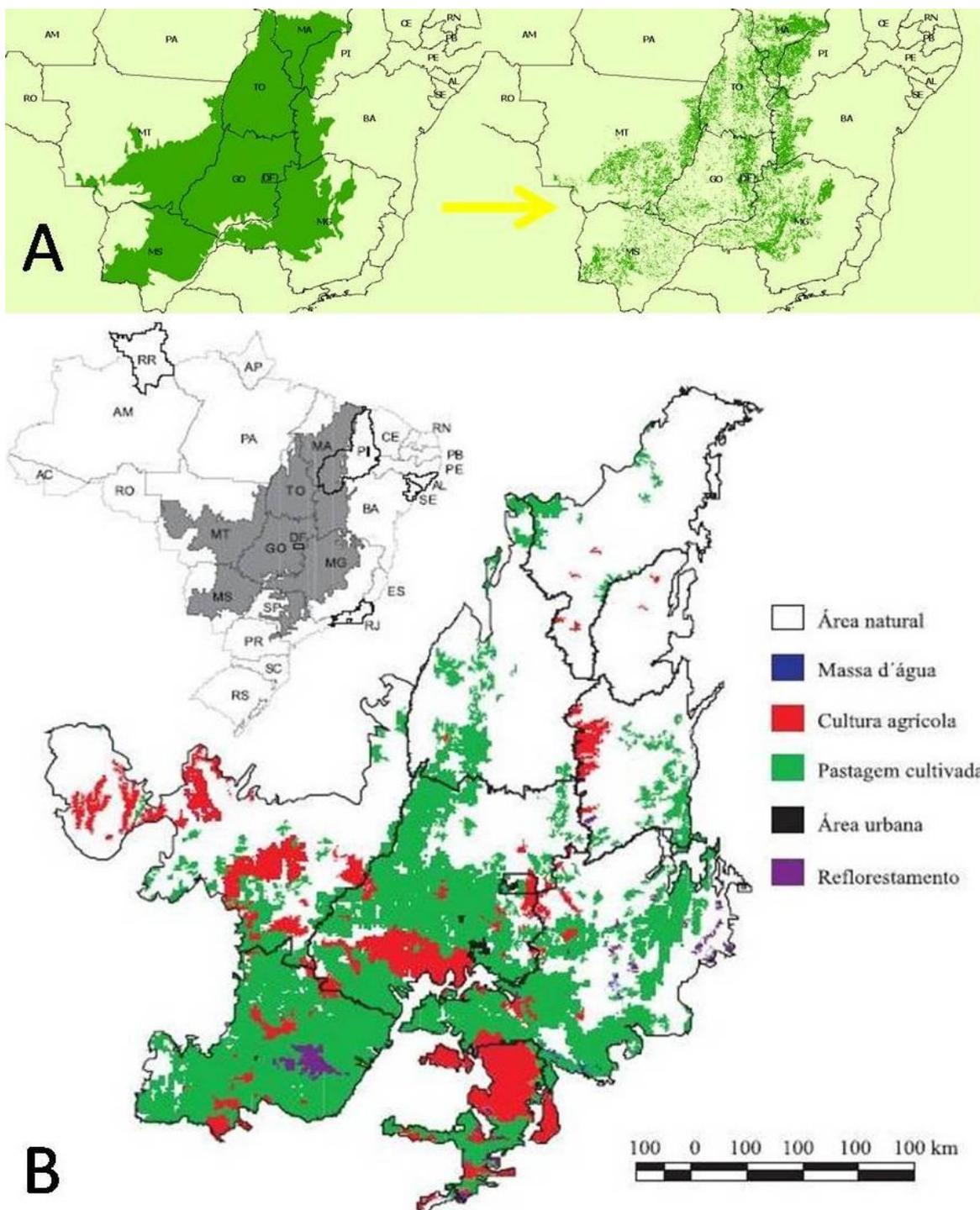


Figura 2.3: A: Mapa resultante da classificação das imagens de satélite do sensor MODIS (Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer) que indica as áreas originais e desmatadas na parte central do Cerrado e os principais blocos remanescentes de vegetação nativa. B: Distribuição espacial das classes de uso da terra no Bioma Cerrado no ano de 2002. Fonte: Machado et al. (2004); Sano et al. (2008).

A biodiversidade pode ser vista como um recurso e como uma propriedade da vida. A singularidade dos trópicos reside exatamente em uma explosão de diversidade em

seus ecossistemas, que se reflete em grande complexidade. A perda de biodiversidade gerada pelo avanço agrícola no Cerrado é preocupante, devido à destruição das comunidades nativas de espécies vegetais, e conseqüente substituição por monoculturas agrícolas, reflorestamentos monoespecíficos e pastagens, sem deixar amostras das formações vegetais que possam funcionar como banco genético e refúgio da fauna e flora (Kageyama & Lepsch-Cunha, 2001; Younés, 2001).

2.2 ESPÉCIES FRUTÍFERAS DO CERRADO

Nos últimos anos a tentativa em divulgar o potencial de utilização de espécies do Cerrado ganhou muitos adeptos, visto que essas plantas são atrativas para a exploração pelo homem devido suas propriedades alimentícias, medicinais, ornamentais, forrageiras, apícolas, produtoras de madeira, cortiça, fibras, óleo, tanino, material para artesanato entre outros (Almeida et al. 1998). Dentre as inúmeras espécies vegetais existentes no Cerrado as frutíferas destacam-se por representarem complemento alimentar na zona rural, bem como apresentarem possibilidade de utilização agrícola. Há um mercado potencial, porém explorado quase que exclusivamente por vendedores ambulantes e feirantes que coletam os frutos em áreas naturais de Cerrado, uma vez que não há cultivos comerciais dessas espécies (Chaves & Naves, 1998; Aguiar & Camargo, 2004).

O bioma apresenta um grande número de famílias botânicas, que oferecem diversidade de frutos comestíveis de formas variadas, cores atrativas e sabor característico como piqui, baru, jatobá, araticum, cagaita, mangaba, cajuzinho-do-campo, arará e perado-campo. Esses frutos podem ser comercializados e consumidos tanto *in natura* ou na forma de produtos derivados como sucos, licores, sorvetes, doces e geléias com grande aceitação popular. Além do interesse na área alimentícia, as espécies frutíferas do Cerrado possuem finalidades múltiplas tais como: uso em áreas de proteção ambiental; reflorestamento; proteção de nascentes e margens de rios e lagos; utilização em hortos florestais, parques, praças, jardins e áreas de lazer além das propriedades medicinais encontrada em várias espécies. Outro fator relevante é que os frutos constituem ainda uma importante fonte de alimentos para animais silvestres do bioma Cerrado como pássaros, roedores, tatus, canídeos e mesmo para o gado. Alguns animais silvestres funcionam como dispersores naturais de sementes, o que permitiu, ao longo dos tempos, um processo de co-

evolução entre plantas e animais (Aguiar & Camargo, 2004; Chaves, 2006; Narain et al. 2006).

Atualmente há uma necessidade de estudos sobre as frutíferas, de forma a minimizar os efeitos da ação do homem sobre o Cerrado, contribuir para a preservação destas espécies e estabelecer condições para sua incorporação ao processo produtivo. A maioria das plantas se encontra em estado silvestre, o que resulta em muita variação dentro da mesma espécie e, de acordo com o local de ocorrência, há grande diferenciação com relação ao formato, tamanho e cores de frutos e altura de plantas. Várias pesquisas são conduzidas para conhecer melhor as espécies sob os aspectos genético, ecológico, fisiológico entre outros, porém, nenhum programa de domesticação foi realizado até agora, o que trás uma grande limitação na oferta do produto. Com isso o mercado fica na dependência da produção natural de frutos. Um programa eficiente de domesticação e o cultivo dessas espécies em lavouras comerciais poderiam solucionar o problema, padronizar a oferta e evitar o intenso extativismo predatório que ocorreu nos últimos anos. (Silva et al., 1997)

2.3 A MANGABEIRA

2.3.1 Taxonomia e nomenclatura

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma árvore frutífera que pertence ao Reino Plantae, Divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, Subclasse Asteridae, Ordem Gentianales, Família Apocynacea, e Gênero *Hancornia*. Foi uma das primeiras espécies frutíferas relatada pelos exploradores da costa do Brasil, no século XVI. O gênero *Hancornia* é monotípico, e a única espécie identificada pelo botânico português Bernardino Antônio Gomes é *Hancornia speciosa* (Monachino, 1945; Almeida et al, 1998; Silva Junior & Lédo, 2006).

A palavra mangaba é de origem indígena (mã'gawa) e significa “coisa boa de comer”, sua maior característica, uma vez que fruto é apreciado em decorrência das excelentes características organolépticas e do elevado valor nutritivo que apresenta. A mangaba pode ainda ser referenciada como corruptela de “mongaba”, que quer dizer grude ou visco, em alusão ao látex exsudado pela planta. Os índios guaranis do Paraguai a chamam de “manga-icé” e, os tupis de “tembiú-catu”, talvez seja uma corruptela de “timiú-

catu”, que significa “comida boa”. Em Sergipe era conhecida como fruta-de-doente, em razão dos frutos, quando maduros, supostamente curarem doenças estomacais. Além da denominação “mangaba”, há outras variantes usadas para nomear o fruto e a árvore no Brasil: mangabeira, mangaíba, mangabiba, mangaúva, mangareíba, mangava, manguba, mangabeira-agreste, mangabeira-brava, mangaba-das-caatingas, mangabinha-das-caatingas, mangabeira-do-norte, mangabeira-mansa, mangabeira-ovo, mangabeira-rana, mangabeira-branca, mangabeira-vermelha, mangabeira-de-goiás, mangabeira-de-minas, tembiú, tembiucatinga e catu (Silva Junior, 2004; Silva Junior & Léo, 2006).

2.3.2 Ocorrência e distribuição natural

É uma planta semidecidual, nativa do Brasil, comum em clima tropical, principalmente em áreas de vegetação aberta como o Cerrado, Tabuleiros, Restingas e até mesmo, em Dunas. Tem ampla distribuição geográfica encontrada nas regiões Sudeste, Norte, Centro-Oeste e Nordeste, com abundância nas áreas de tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas da Região Nordeste (ocorre desde o Estado do Amapá até São Paulo). Há relatos de sua ocorrência também no Paraná e no Amazonas. Porém, não em áreas de florestas. Fora do Brasil já houve registro da espécie na Bolívia, Paraguai, Chaco da Argentina e Peru (Nogueira & Albuquerque, 2006; Silva Junior et al., 2006). Em um levantamento efetuado por Naves (1999), a espécie foi uma das mais frequentes, com ocorrência em 32 das 50 áreas de Cerrado de Goiás prospectadas. Ribeiro & Walter (1998) citam a mangabeira com uma das 26 espécies com ocorrência em pelo menos 50% de 98 áreas de Cerrado *stricto sensu* levantadas e, portanto uma das mais frequentes entre as 534 espécies arbóreas encontradas. Segundo Giacometti (1993), os principais centros de diversidade genética associados à mangabeira são: Costa Atlântica e Baixo Amazonas, principalmente Pará e Amapá; Nordeste/Caatinga, sobretudo as áreas de tabuleiros de savana e zonas de transição Catinga-Cerrado; Brasil Central/Cerrado; Mata Atlântica, nas áreas de cerrados litorâneos e restingas (Figura 2.4).

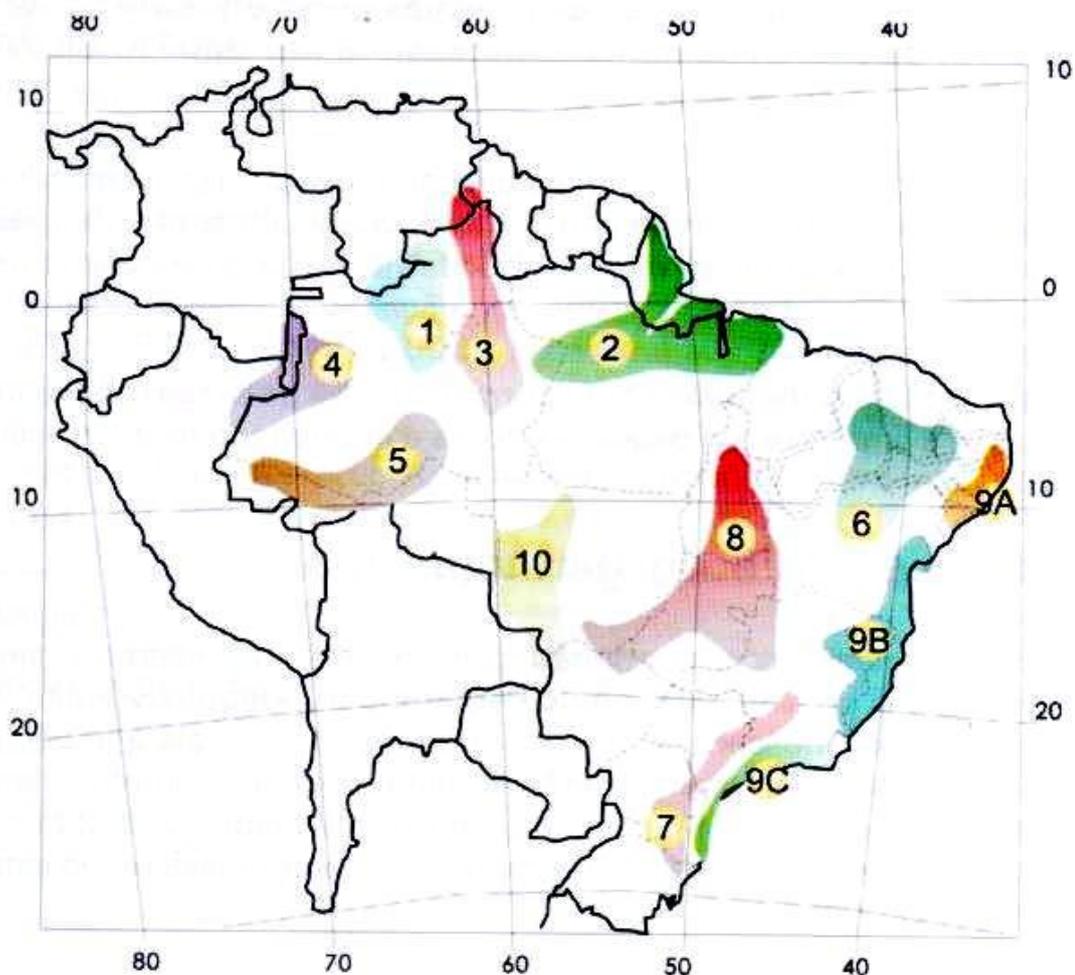


Figura 2.4: Centro de diversidade de espécies fúteras do Brasil. 1) Alto Noroeste/Rio Negro; 2) Costa Atlântica e Baixo Amazonas; 3) Roraima/Manaus; 4) Oeste do Amazonas/Solimões; 5) Sudoeste Acre/Rondônia; 6) Centro Nordeste/Caatinga; 7) Sul-Sudeste; 8) Brasil Central/Cerrado; 9) Mata Atlântica (9A: Nordeste – da costa do Rio Grande do Norte e Alagoas, 9B: Bahia/ Espírito Santo/ Vale do Rio Doce – do litoral de Sergipe ao Espírito Santo); 10) Brasil (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul)/Paraguai. Os principais centros de diversidade genética associados a mangabeira são: Centro 2, 6, 8, 9A e 9B. Fonte: Giacometti (1993), In: Silva Junior et al. (2006).

2.3.3 Fenologia e Morfologia

A mangabeira é uma árvore perene, de porte médio, com altura que varia de 4 m a 7 m e pode atingir até 15 m de altura. É glabra ou pubescente, dotada de copa arredondada e ampla (Figura 2.5). O crescimento é lento. O tronco é geralmente único tortuoso ou reto, com 0,2 m a 0,3 m de diâmetro, de aspecto áspero. Os ramos são inclinados, numerosos, separados e bem formados, revestido por casca suberosa mais ou menos áspera, de 20 cm a 30 cm de diâmetro. Os ramos jovens são de coloração violácea,

lisos até um ano de idade, meio angulosos, curtos, com poucas folhas, floríferos no ápice. Apresenta caule rugoso e áspero com duas ou três bifurcações na altura média de 40 cm a 50 cm da base. A raiz é pivotante profunda, circundada de raízes secundárias bem desenvolvidas, dispostas obliquamente em relação a principal (Monachino, 1945; Almeida et al, 1998; Silva Júnior, 2003; Silva Junior & Léo, 2006).



Figura 2.5: Planta adulta de mangabeira. Foto: Lázaro José Chaves (2008).

As folhas são simples, pecioladas, geralmente decíduas, opostas, uniformemente espaçadas, brilhantes, coriáceas, elípticas, oblongo ou elíptico-lanceoladas nas duas extremidades, às vezes obtuso-subacuminadas no ápice, e possui de 3,5 cm a 10,0 cm de comprimento por 1,5 cm a 5,0 cm de largura, de coloração avermelhada quando novas e ao caírem (Figura 2.6). São ainda glabras nas duas faces ou pubescentes, oliváceo-enegrescentes na face ventral, mas descoradas na dorsal; pecíolo de 3 mm a 15 mm, axilar, fino, glabo ou pubescente, biglanduloso (Monachino, 1945; Almeida et al, 1998; Silva Júnior, 2003; Silva Junior & Lédo, 2006).



Figura 2.6: Progênes de mangabeira pertencentes ao banco de germoplasma da Universidade Federal de Goiás e representam as variedades botânicas *H.s. var pubescens*, *H.s. var cuyabensis*, *H.s. var gardneri* e *H.s. var speciosa*. Destaque para as folhas de mangabeiras e microestrutura foliar de mangabeiras. Foto: Lázaro José Chaves (2008), Rita Devós Ganga (2008) e Túlio Carmo (2009).

Em uma revisão taxonômica da espécie foram aceitas seis variedades botânicas que se diferenciam por características morfológicas, principalmente relacionadas à folha e à flor (Tabela 2.1): *H. speciosa* Gomes (variedade típica) ou *H. speciosa* var. *speciosa*, *H. speciosa* var. *maximiliani* A. DC., *H. speciosa* var. *cuyabensis* Malme, *H. speciosa* var. *lundii* A. DC., *H. speciosa* var. *gardneri* (A. DC.) Muell. Arg., *H. speciosa* var. *pubescens*

(Nees. et Martius) Muell. Arg., (Monachino, 1945; Silva Júnior, 2003; Silva Junior & Lédo, 2006). Rizzo & Ferreira (1990) relataram a existência das variedades botânicas *H. speciosa* var. *speciosa*, *H. speciosa* var. *gardneri* (A. DC.) Muell. Arg. e *H. speciosa* var. *pubescens* (Nees. et Martius) Muell. Arg., no estado de Goiás. A variedade típica *speciosa* ocorre nas regiões da divisa com Bahia, Piauí e Maranhão e estende-se até o paralelo 13°S, portanto no atual Estado do Tocantis. As outras duas têm distribuição em quase todo estado de Goiás (Chaves, 2006). Segundo Silva Júnior, 2003, a variedade botânica *H. speciosa* var. *cuyabensis* tem ocorrência no Mato Grosso. Já *H. speciosa* var. *maximiliani* A. DC. E *H. speciosa* var. *lundii* A. DC., são encontradas no Estado de Minas Gerais.

Tabela 2.1: Diferenças morfológicas entre as variedades botânicas de *H. speciosa* Gomes.

Var. Botânica	Pecíolo	Limbo	Informações diversas
<i>H. speciosa</i> Gomes	9 a 15 mm de comprimento	6 cm de comprimento e 2 cm de largura	Pedicelos glabos, Cálice glabro ou raramente pubescente externamente
<i>H. speciosa</i> var. <i>maximiliani</i> A. DC	Cerca de 8 mm de comprimento	5 a 6 cm de comprimento e 2,0 a 2,5 cm de largura	
<i>H. speciosa</i> var. <i>cuyabensis</i> Malme	cerca de 3 mm de comprimento	4 a 10 cm de comprimento e 1,5 a 3,0 cm de largura	Corola grande, glabra externamente, cálice glabro externamente
<i>H. speciosa</i> var. <i>lundii</i> A. DC	3 a 5 mm de comprimento	5 a 7 cm de comprimento e 3 cm de largura	Pedicelos pubescentes, Corola com lóbulos pubescentes externamente, cálice cerdoso-pubescente externamente
<i>H. speciosa</i> var. <i>gardneri</i> (A. DC.) Muell. Arg.:	Curto com 3 a 5 mm de comprimento	7 a 10 cm de comprimento e cerca de 4 cm de largura. glabro na face dorsal ou pubescente na parte inferior da nervura central	
<i>H. speciosa</i> var. <i>pubescens</i> (Nees. et Martius) Muell. Arg.:	Curto com 3 a 5 mm de comprimento, pubescente	pubescente na parte inferior, com 6 a 12 cm de comprimento e 3 a 6 cm de largura	Corola maior com lóbulos cerdoso-pubescente na parte inferior da nervura central ; Ramos densamente pubescentes

A existência de variedades botânicas diferentes pressupõe uma história evolutiva com restrição ao fluxo gênico por um longo período de tempo. Portanto, a diferenciação observada entre a variedade *H.s.* var. *speciosa* e as demais, pode relacionar-se a mecanismos de isolamento por distância, uma vez que ocorrem em regiões distintas. Esse isolamento poderia ser resultado de colonização feita por diferentes populações ancestrais. A diferenciação morfológica do tamanho do pecíolo e limbo foliar é marcante e facilmente reconhecível a campo. Porém, na região limítrofe de ocorrência da variedade *speciosa* (nordeste de Goiás, na divisa com Bahia) é possível observar plantas com

características intermediárias, o que leva à hipótese de hibridação entre os dois tipos (Coelho e Valva, 2001; Chaves, 2006).

As flores são brancas hipocrateriformes, com tubo floral longo e estreito (3 cm a 4,5 cm de comprimento), actimórficas (Figura 2.7). Apresenta cinco sépalas ciliadas. Os estiletes dos cinco estames estão inseridos na metade superior do tubo floral. Entre os estiletes encontram-se orifícios com cerca de 1 mm de diâmetro, por onde passam as peças bucais dos visitantes florais. Os orifícios estendem-se em direção à base do tubo floral, delimitados por dez fileiras de pêlos. Cinco fileiras formadas de pêlos relativamente grossos estão situadas sobre os locais de inserção dos estiletes e são intercaladas por outras cinco fileiras de pêlos mais finos. Juntas, estas fileiras agem como guias das peças bucais dos visitantes em direção à base da corola. A cerca de 1 cm da base da corola, há apenas as fileira de pêlos grossos (Monachino, 1945; Silva Junior & Lédo, 2006; Souza & Lorenzi, 2008).



Figura 2.7: Flores de mangabeira. Foto: Lázaro José Chaves (2008).

As inflorescências são em dicásio ou cimeira terminal em ramos novos, com duas a quatro ou até cinco flores hermafroditas em forma de campânula, ocasionalmente flores isoladas; corola hipocrateriforme, de pré-floração contorcida, branca e

posteriormente rósea ou amarela, tubulosa e perfumada; lobos de 1,0 cm a 1,5 cm de comprimento; pedicelos de 6 mm a 8 mm, que desaparecem junto a um cálice de 1 mm a 2 mm de comprimento, que é glabro ou pubescente, com cinco lacínios ovais, obtusos, de margem ciliada. O androceu possui cinco estames, epipétalos; anteras lanceoladas com aproximadamente 2 mm de comprimento de filetes curtos e deiscência rimosa. O gineceu possui ovário com aproximadamente 2 mm de comprimento unilocular, pluriovular e glabro; estilete longo, com 2,5 cm de comprimento e estigma típico da família (em carretel). Floresce durante os meses de setembro-novembro, ainda com os frutos da florada anterior. (Monachino, 1945; Almeida et al, 1998; Silva Junior & Léo, 2006; Souza & Lorenzi, 2008).

A mangabeira, assim como as outras Apocynaceae, evoluiu um aparelho de polinização único entre as angiospermas, com apresentação secundária de pólen. Há uma fusão pós-genital dos ápices dos carpelos, cuja parte superior formará uma cabeça estigmática que apresenta uma compartimentalização vertical em três regiões: uma apical para deposição de pólen endógeno, seguida por uma secretora que produz uma substância adesiva a uma basal com a superfície estigmática receptiva. As modificações evolutivas da cabeça estigmática foram acompanhadas por diferenciações das anteras o que aumenta o grau de ligação entre estas duas partes da flor. As anteras liberam seu pólen em um espaço acima da cabeça estigmática que forma uma câmara de pólen. Desta forma, o pólen não está disponível como recurso alimentar para os visitantes florais e o néctar é o único recurso floral coletado. Em busca do néctar, o visitante leva a probóscide ao fundo da corola. Ao ser retirada, a probóscide é raspada pelo anel inferior de pêlos da cabeça estigmática, fato que libera o pólen exógeno na zona receptiva do estigma. Ocorre um deslizamento para a porção média da cabeça estigmática (coberta pela substância adesiva depositada nesta região), com direcionamento para o centro do tubo que passa pela câmara polínica de onde remove o pólen. Portanto para autopolinizar uma flor, o visitante floral deve inserir as peças bucais na mesma flor pelo menos duas vezes seguidas. Assim, duas investidas consecutivas por um indivíduo em uma mesma flor são raras de serem observadas, o que favorece um sistema de polinização cruzada. Os ovários contêm em média 76 óvulos e os nectários encontram-se na base da flor (Monachino, 1945; Almeida et al, 1998; Darrault & Schlindwein, 2006; Silva Junior & Léo, 2006; Souza & Lorenzi, 2008).

Segundo estudos realizados no tabuleiro paraibano, a mangabeira floresce de outubro a janeiro em que o pico da floração encontrado ocorreu em novembro e dezembro e a frutificação de janeiro a abril. A antese das flores inicia-se entre 15 h e 16h30, e perdura até as 10 h da manhã seguinte. As flores abrem e fecham sincronicamente, em que durante essa abertura há uma deflexão da parte livre das pétalas que se recurvam, formando um ângulo maior que 90° em relação ao centro do tubo floral. No dia seguinte à antese, as flores murcham e torna-se de cor castanha. O odor adocicado liberado pelas flores intensifica-se ao anoitecer e mantém-se intenso por toda a noite. Por volta das 10 h da manhã seguinte, o odor se encerra (Darrault & Schlindwein, 2006).

Há uma auto-incompatibilidade entre as estruturas de reprodução, o que torna a espécie obrigatoriamente dependente de polinizadores (Silva Junior & Lédo, 2006; Souza & Lorenzi, 2008). Essa auto-incompatibilidade foi constatada por Darrault & Schlindwein (2006) que realizaram testes manuais de autopolinização e polinização cruzada, bem como polinização espontânea. Os autores relatam que houve desenvolvimento inicial dos frutos provenientes de todos os tratamentos de polinização manual; contudo, apenas um decorrente de autopolinização se desenvolveu e todos os provenientes de autopolinização espontânea foram abortados.

A mangabeira é uma planta que se reproduz naturalmente por alogamia. Ocorre um tipo de reprodução anômala, a poliembrião, que consiste no desenvolvimento de mais de um embrião por óvulo, o que permite o desenvolvimento de mais de uma plântula na mesma semente germinada. O tipo de dispersão foi classificado como baracórico, que é o grupo de plantas possuidoras de frutos pesados que, normalmente, caem junto à planta-mãe e, às vezes ali, conseguem se reproduzir ou têm suas sementes transportadas pelos animais para outros locais (diszoocoria) (Salomão & Allem, 2001; Silva Junior & Lédo, 2006).

Em estudos realizados por Darrault & Schlindwein (2006), foi constatado que a flor de mangabeira libera um aroma adocicado ao anoitecer, o que sugere polinização por esfingídeos. Foram registrados 77 indivíduos de 33 espécies de visitantes florais, todos insetos. Onze são espécies de abelhas (Hymenoptera) e 23 de Lepidoptera. Destas, 50% são espécies de Sphingidae, 39% de Hesperiididae e 9% de Nymphalidae. Os visitantes diurnos mais comuns foram as abelhas Euglossini (Apidae) e borboletas Nymphalidae. Os hesperídeos foram mais frequentes nos períodos crepusculares matutinos e os esfingídeos à noite.

Os frutos amadurecem em novembro/janeiro no Nordeste. No Cerrado, os frutos amadurecem em outubro/novembro. São do tipo baga, elipsoidal ou arredondado de 2,5 cm a 6,0 cm e podem ocorrer vários tamanhos na mesma planta (Figura 2.8). Quando maduros, apresentam polpa mole, viscosa, com sabor doce, ácido, com boa digestibilidade (Narain et al., 2006). O peso oscila entre cinco e 50 g. O exocarpo é amarelo, com manchas ou estrias avermelhadas, polpa de sabor suave, doce, carnososo-viscosa, ácida. Contém geralmente de duas a 15 ou até 30 sementes discóides (chatas) de 7 mm a 8 mm de diâmetro, castanho-claras, delgadas, rugosas, com hilo no centro.



Figura 2.8: Frutos de mangabeiras. Foto: Lázaro José Chaves (2008).

A mangabeira desenvolve-se em temperatura média de entre 24°C e 26°C, porém é possível ser encontrada em temperaturas mínimas e máximas de 15°C a 43°C respectivamente. Apresenta maior desenvolvimento vegetativo em épocas de temperaturas mais elevadas. É encontrada em várias altitudes, desde áreas ao nível do mar até 1.500 m. Por ser uma planta heliófita, é muito exigente em luminosidade. A pluviosidade ideal para

seu cultivo está entre 750 mm a 1600 mm anuais, bem distribuída. Tolera períodos curtos de déficit hídrico, característicos das regiões em que se desenvolve. Os solos nos quais se desenvolve são pobres e de textura arenosa. Na região do Cerrado brasileiro, a mangabeira também está associada a solos dos tipos concrecionários e Neossolos Litólicos (Chaves & Moura, 2003; Nogueira & Albuquerque, 2006).

2.3.3 Potencialidades de uso

Recentemente, o interesse pela cultura da mangabeira no Brasil, e mais particularmente nas Regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste cresceu substancialmente. Em Sergipe, o preço do fruto ultrapassa o da uva e de outros frutos nobres. Apesar disto, a produção continua a ser essencialmente extrativista salvo raras exceções. Não existem, ainda, pomares organizados ou implantados com a finalidade de exploração racional para a produção de frutos. Há ausência de plantios comerciais, o que demonstra que a produção de frutos, direcionadas para as indústrias, são provenientes de plantas remanescentes (Alves et al., 2006; Lederman & Bezerra, 2006).

Para o consumo do fruto, é possível obtê-lo ao natural, em sucos ou utilizá-lo para produção de polpas congeladas, sorvetes, licores, xarope, vinagre, vinhos, geléia, compotas e doces. O fruto verde é impróprio para o consumo. Em alguns casos, pode ser venenoso por causar intoxicações que levam a morte (Almeida et al, 1998; Narain et al., 2006; Silva Junior et al., 2006). Embora a fruta seja o principal produto explorado, outras partes da planta têm aplicação na medicina popular como a casca que apresenta propriedades adstringentes e o chá da folha é usado contra cólica menstrual. Há relatos do uso da entrecasca e da raiz como purgantes, em doenças uterinas e como estimulantes do fluxo menstrual. O extrato da casca é amargo e em pequenas doses é empregado na obstrução do fígado, na icterícia e em doenças crônicas da pele (Almeida et al, 1998; Silva-Júnior, 2004).

Toda mangabeira exsuda látex de cor branca ou róseo-pálida. A borracha de mangabeira embora mole, de elevada plasticidade, enquadra-se perfeitamente em especificações dos padrões internacionais de classificação (Monachino, 1945; Pinheiro, 2003). O látex de mangabeira foi muito explorado durante a Segunda Guerra Mundial na produção de borracha para exportação, porém, com a domesticação da seringueira, esse quadro mudou devido à oferta do produto a baixo preço. O látex pode ainda ser empregado

contra inchaços (provocado por pancadas), doenças pulmonares, tuberculose, úlceras, herpes e ainda vermes, de acordo com a forma de preparo (Pinheiro & Pinheiro, 2006; Silva-Júnior et al., 2006).

2.3.4 Germinação e desenvolvimento inicial

A maior parte de estudos referentes à cultura é concentrada na determinação das condições que propiciem maiores taxas de germinação e vigor às plântulas, tais como profundidade de semeio, tipos de substrato, retirada ou não do tegumento, etc. Fatores como luz, umidade, aeração, temperatura e a presença de sais ou patógenos podem interferir na porcentagem de germinação e no vigor da plântula (Nogueira & Albuquerque, 2006). A utilização de sementes para a formação de mudas ainda é o meio de propagação mais comum para a mangabeira. Esse tipo de propagação tem como desvantagens o longo período de imaturidade das plantas e a variabilidade genética das progênes quanto ao crescimento, desenvolvimento, quantidade e qualidade de frutos produzidos, além de outros caracteres agrônômicos importantes na fruticultura comercial. O plantio de mudas obtidas por sementes é recomendado, sobretudo, para a recuperação de áreas degradadas e recomposição da reserva legal das propriedades rurais, pois se trata de medida que visa reparar, com máxima variabilidade genética, pelo menos em parte, a diversificada vegetação nativa destruída. Essa estratégia, aliada ao estabelecimento de pomares dessa fruteira, com exploração da propagação sexuada, possibilitaria o atendimento da demanda de frutos para o consumo, respeitando os aspectos ambientais (Pereira, E. et al., 2006).

A semente da mangabeira é considerada recalcitrante e, portanto, a redução de sua umidade pode fazer com que a mesma perca a sua capacidade de germinar. As sementes devem ser semeadas rapidamente após sua retirada do fruto (Nogueira & Albuquerque, 2006). Essa característica da semente, associada ao fato da alogamia na espécie, dificulta a propagação da mangabeira por métodos tradicionais, uma vez que resulta no alto grau de variabilidade de muitas características de importância econômica. Essa variabilidade é importante em programas de melhoramento, que se baseia no aproveitamento desta variabilidade natural, via seleção, mas inadequada para o cultivo econômico e racional das culturas. É de fundamental importância, portanto, desenvolver

métodos eficientes de propagação vegetativa, a fim de multiplicar com segurança genótipos superiores (Chaves, 2006; Lemos et al., 2006).

Para a introdução ao cultivo comercial da mangabeira, seria recomendada a determinação de técnicas adequadas de propagação. A propagação assexuada representaria uma boa alternativa, pois possibilita a clonagem de plantas selecionadas diretamente na natureza ou provenientes de hibridações dirigidas e mantém seus caracteres desejáveis. Isso resultaria na formação de mudas de alta qualidade e de pomares mais uniformes e precoces, com maior produtividade e melhor qualidade de frutos, porte mais adequado ao manejo e a colheita, resistência a doenças e outros caracteres importantes na fruticultura. Porém, é importante levar em consideração a auto-incompatibilidade da planta. Nesse caso seria necessário o plantio de diferentes clones para permitir o fluxo gênico. A propagação assexuada pode ocorrer de modo natural em certas espécies, por meio de diversos tipos de propágulos. Porém, quando a espécie de interesse não apresenta reprodução vegetativa natural, como a mangabeira, deve-se buscá-la por outros métodos artificiais, como a enxertia, a estaquia e a cultura de tecidos (Pereira, A. et al., 2006).

2.3.5 Implicações para o melhoramento genético e conservação.

A conservação eficiente da variabilidade genética de uma espécie depende, basicamente, da manutenção *in situ* ou *ex situ* de amostras com tamanho efetivo adequado. Para espécies nativas, a estrutura genética das populações interfere grandemente na representatividade das amostras. Quando ocorre alguma variação entre subpopulações, mesmo que percentualmente pequena, torna-se necessário uma amostragem de um elevado número de subpopulações para garantir um tamanho efetivo adequado (Vencosvsky & Crossa, 1999; Chaves, 2006). As áreas de dispersão da mangabeira sofrem visível redução e existe uma ameaça de extinção, principalmente nos Tabuleiros Costeiros e Baixadas Litorâneas do Nordeste. A redução das áreas de dispersão coincide com a crescente demanda de frutos nas indústrias locais de sucos. Na região Centro-Oeste, existe forte indicativo da utilização da mangaba e produtos derivados, porém, devido à grande pressão antrópica sobre o bioma Cerrado, a possibilidade de obtenção de frutos em quantidade e qualidade, de forma extrativista, tornou-se mais restrita (Lederman & Bezerra, 2003; Nascimento et al., 2003).

O aumento da cultura da mangabeira é restringido devido a algumas características da planta. O crescimento lento até atingir a fase reprodutiva, que se dá aos 4-5 anos de idade, e a forte sazonalidade, os frutos só podem ser coletados 3-4 meses ao ano. Essas dificuldades poderiam ser resolvidas a partir de práticas culturais adequadas e programas que visem à conservação e o melhoramento genético da planta (Lederman & Bezerra, 2006). As plantas não recebem qualquer tipo de manejo que potencialize sua capacidade produtiva. Para o incremento da produção de mangabas é necessário que cultivos dessa planta sejam estabelecidos em locais que sustentem fortes populações de polinizadores. É favorável que a plantação esteja inserida em uma matriz de vegetação natural que apresente uma alta heterogeneidade ambiental e uma elevada diversidade de espécies vegetais que forneçam alimento para os polinizadores adultos em períodos em que a mangabeira não esteja florida, sítios de nidificação para abelhas; fontes de alimento para larvas e recursos florais, como perfumes e resinas, para manutenção de Euglossini. (Darrault & Schlindwein, 2006; Vieira Neto, 2006).

A mangabeira pode ser considerada uma espécie tipicamente selvagem. Os poucos plantios em sistemas agrícolas foram feitos a partir de sementes coletadas em matrizes selvagens, com um mínimo de seleção, o que é insuficiente para provocar mudanças nas características e hábitos da espécie. Em decorrência da grande variabilidade genética própria das populações selvagens, qualquer programa de melhoramento genético deve se basear, de início, no aproveitamento desta variabilidade natural, via seleção. Duas estratégias de melhoramento seriam aplicáveis a espécie para este fim: uso de variedades de polinização aberta, propagadas via semente e seleção visando o plantio comercial de clones, via propagação sexuada. No caso do uso de variedades de polinização aberta propagada por semente, o método mais adequado seria o de seleção recorrente, que envolve a seleção e recombinação de plantas ou progênies superiores, o que gera uma nova população em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esse esquema tem como objetivo elevar a frequência dos alelos favoráveis na população provocando alterações lentas e cumulativas ao longo das gerações de seleção. Para uma espécie perene, como a mangabeira, os resultados de um programa com esta estratégia só seriam sentidos a longo prazo. Por outro lado, é um método seguro e que respeita o sistema natural de reprodução da espécie. Variedades de polinização aberta mantêm a variabilidade genética e possuem menor vulnerabilidade frente a estresses bióticos e abióticos, em relação a cultivares homogêneas. No caso da propagação assexuada, a técnica de enxertia já foi testada com sucesso em

mangabeira do Cerrado e tem como vantagem adicional o encurtamento do intervalo entre o plantio e início de produção. A seleção de clones representa uma alternativa com maiores possibilidades de ganho em curto prazo e pode ser integrada com a seleção recorrente em um programa amplo de melhoramento. Ao integrarem-se as duas estratégias em um programa de longo prazo, os ensaios de progênies maternas ou o campo de recombinação das progênies selecionadas poderiam ser utilizados para seleção de matrizes para geração de novos clones por propagação assexuada. Da mesma forma, clones superiores avaliados em ensaios poderiam ser intercruzados para gerar novas populações de seleção (Dias & Kageyama, 1991; Chaves, 2006).

2.4 ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE PLANTAS

Do ponto de vista genético, uma população é definida como um conjunto de indivíduos que compartilham o mesmo pool gênico e que convivem em áreas de tamanho suficientemente restrito para que tenham chance de se intercruzarem. As diferenças genéticas que ocorrem de modo natural entre os indivíduos envolvem informações sobre seqüências de DNA que podem resultar em divergência genética. A diversidade das espécies representa o alcance das adaptações evolucionárias e ecológicas das espécies em determinado ambiente e a sua identificação e quantificação são igualmente importantes para o melhoramento genético, na busca de caracteres úteis à seleção (Mayr, 1970; Falconer, 1987; Primack & Rodrigues, 2001).

A estrutura genética de uma população refere-se a um conjunto de características genéticas e demográficas resultantes da ação e das interações de vários mecanismos evolutivos e ecológicos e, de alguma maneira, denota a ação desses processos no presente e no futuro. Tal estruturação pode manifestar entre populações geograficamente distintas, dentro de um grupo local de plantas, ou mesmo nos indivíduos de uma progênie. Em condições naturais, a manutenção e a dinâmica da estrutura genética de uma população resultam da interação entre um conjunto complexo de fatores evolutivos, tais como variação no conjunto gênico, organização dessa variação nos genótipos, distribuição espacial desses genótipos, sistema reprodutivo, dispersão da progênie no campo, eventos estocásticos e processos de crescimento, mortalidade e substituição que originam as futuras gerações. A variabilidade genética é introduzida continuamente nas populações por mutação e migração de indivíduos ou genes de outras

populações e é perdida por deriva genética, por endocruzamento e, no caso de genes não neutros, pela seleção natural (Mayr, 1970; Falconer, 1987).

Mutações são mudanças na sequência dos nucleotídeos do material genético de um organismo e possibilitam variações no conjunto de genes da população. Podem ser causadas por erros de cópia do material durante a divisão celular, por exposição a radiação ultravioleta ou ionizante, mutagênicos químicos, ou vírus. As mutações desfavoráveis podem ter sua frequência reduzida na população por meio da seleção natural, enquanto que as mutações favoráveis podem se acumular, o que resulta em mudanças evolutivas adaptativas. As mutações neutras não influenciam a aptidão dos indivíduos e podem se acumular ao longo do tempo devido à deriva genética. Enquanto a mutação cria variação, a recombinação reorganiza os genes já existentes nos cromossomos. Esse fenômeno ocorre na reprodução sexuada, e se realiza em duas fases consecutivas: gametogênese e fecundação. Associado a isso, o *crossing-over*, aumenta a variabilidade genotípica uma vez que estabelece novas combinações entre os genes e aumenta o número de tipos diferentes de gametas. Formados os gametas, pode ocorrer a fecundação cruzada ou autofecundação. Populações de indivíduos que apresentam fecundação cruzada têm maiores possibilidades de aumentar a variabilidade genética sem adição de genes novos do que populações de indivíduos com autofecundação. Nesse sentido algumas espécies, ao longo de sua evolução, desenvolveram vários mecanismos que dificultam a autofecundação e favoreceram a fecundação cruzada (Mayr, 1970; Stearns & Hoekstra, 2003).

A seleção natural é o principal fator evolutivo que atua sobre a variabilidade genética da população, pois seleciona genótipos melhores adaptados a uma determinada condição ecológica, e elimina aqueles desvantajosos para essa mesma condição o que, portanto, tende a diminuir a variabilidade genética. Acredita-se que indivíduos homocigotos se adaptam melhor a um ambiente estável livre de qualquer modificação, já os indivíduos heterocigotos teriam uma chance maior em ambientes instáveis, pois teriam uma maior plasticidade quanto a seus caracteres para se adaptarem a qualquer nova mudança. O heterocigoto pode ser mais resistente a qualquer variação ambiental, pois apresenta diversidade em alelos que podem, por sua vez, responder diferentemente aos desafios do ambiente (Mayr, 1970; Falconer, 1987).

A deriva genética ocorre apenas em populações pequenas. Nestas, qualquer alteração ao acaso pode modificar a frequência genotípica e levar até mesmo à eliminação de determinados genótipos. Um caso particular de deriva genética é o princípio do

fundador, que se refere ao estabelecimento de uma nova população a partir de poucos indivíduos que emigram da população original. Esses indivíduos serão portadores de pequena fração da variação genética da população de origem e seus descendentes apresentarão apenas essa variabilidade, até que genes novos ocorram por mutação. Além disso, essa pequena população sofrerá os efeitos dos vários fatores evolutivos, o que pode resultar na origem de indivíduos diferentemente adaptados (Mayr, 1970; Falconer, 1987; Stearns & Hoekstra, 2003).

O sistema reprodutivo pode ser considerado como o fator mais influente na estrutura genética das populações, pois é ele quem determina como as informações genéticas serão transferidas de uma geração a outra, o que influencia diretamente em suas frequências alélicas e genótípicas. As espécies alógamas mantêm a maior parte da sua variação genética dentro das suas populações, enquanto que, em espécies autóginas, esta variação encontra-se, em maior grau, entre populações. O sistema misto de reprodução, por sua vez, prediz variabilidade genética intermediária entre espécies de autofecundação e alógamas. Diversos fatores podem afetar o sistema reprodutivo de uma espécie tais como o tamanho e a densidade populacional, a sincronia no florescimento e os padrões fenológicos, o grau de estruturação genética nas populações e a presença de mecanismos de auto-incompatibilidade (Mayr, 1970; Falconer, 1987; Futuyma, 1992).

Os processos imigratórios permitem a introdução de genes novos e contribuem consequentemente para o aumento da variabilidade genética da população. O resultado disso é um fluxo gênico, que tende a diminuir as diferenças genéticas entre as populações de uma mesma espécie. A importância do fluxo gênico está em contrapor os efeitos da deriva genética e pode ser quantificado por meio de medidas diretas (fluxo gênico contemporâneo, baseados em observações no movimento dos vetores de pólen e sementes, na marcação do pólen e sementes, ou na identificação de alelos ou genótipos migrantes, com o uso de corantes, marcadores morfológicos e análise de paternidade) ou indiretas (fluxo gênico histórico; baseiam-se na distribuição da diversidade genética entre populações) (Mayr, 1970; Falconer, 1987; Futuyma, 1992).

Quando o fluxo gênico é restrito, as subpopulações tendem a um menor tamanho efetivo e maior endogamia e, como resultado, maior probabilidade de se diferenciarem. O tamanho efetivo de uma população é o número de indivíduos que efetivamente participam na reprodução e que contribuem para a geração seguinte. Em populações naturais ocorre a sobreposição de gerações. Há, portanto indivíduos que ainda

não atingiram a idade reprodutiva e outros que já a ultrapassaram. Para fins genéticos, essas duas categorias não contam para o tamanho efetivo da população e assim, muitas vezes o tamanho efetivo costuma ser inferior ao tamanho da população. Outros fatores contribuem para a redução desse tamanho, como o número desigual de indivíduos masculinos e femininos, as diferenças de fertilidade entre eles, o assincronismo no florescimento. Além disso, depende dos níveis de endogamia e parentesco existentes na população e, portanto, quanto maiores estes níveis, menor é a representatividade genética dos indivíduos (Mayr, 1970; Falconer, 1987; Futuyma, 1992).

Uma população de tamanho infinito, que pratica cruzamentos ao acaso, está em equilíbrio de Hardy-Weinberg quando suas frequências alélicas e genotípicas não se alteram nas sucessivas gerações, e há total ausência de migração, mutação, seleção e deriva genética. Baseado nesse princípio é possível o cálculo da frequência dos genótipos, a partir das frequências dos alelos. Os estudos sobre análise de estrutura genética das populações teve início com as estatísticas-F (que refletem a caracterização dos níveis de diversidade e a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações) e conta hoje com outras formulações mais recentes, tais como análise de variância de frequências alélicas (Weir, 1996) e a análise de variância molecular (Excoffier et al., 1992). Entretanto, essas técnicas permitem apenas uma descrição geral da heterogeneidade espacial existente. Inferências sobre a atuação dos processos microevolutivos nas populações devem ser efetuadas mediante análises de autocorrelação e comparação de matrizes (Telles, 2000; Telles et al., 2001a; Telles et al., 2001b).

A caracterização da variabilidade genética dentro de populações é efetuada a partir de medidas de diversidade intrapopulacional, como a porcentagem de locos polimórficos; número médio de alelos por loco polimórfico; heterozigotidade média observada por loco; heterozigose média esperada por loco e o número efetivo de alelos. Um determinado alelo, em um grupo de indivíduos diplóides, tem como frequência duas vezes o número de indivíduos homozigóticos para o alelo, mais o número de indivíduos heterozigotos no grupo. Em amostras grandes é maior a chance de se detectarem alelos raros, pois o número de alelos observados por loco aumenta em função do tamanho da amostra (Mayr, 1970; Falconer, 1987). O grau de heterozigotidade esperada é considerado a medida mais completa de variabilidade genética intrapopulacional, pois sumariza a variação genética de uma população numa única estatística. Como medida de variabilidade, tem como principais vantagens a sua relativa insensibilidade ao tamanho

amostral, quando comparada a outras medidas e a fácil interpretação do seu significado. Como desvantagem, tem a dependência da frequência dos dois alelos mais comuns (Nei, 1972, 1978; Weir, 1996).

Os estudos relativos à organização da variabilidade ou estrutura genética das populações naturais de plantas permitiram grandes avanços no conhecimento relativo aos processos microevolutivos e, conseqüentemente, nas estratégias de domesticação, manejo e conservação dessas espécies. A conservação deveria ser pensada de forma a preservar a máxima variabilidade genética dentro das espécies, pois existe uma relação entre extinção e variabilidade genética. A perda da variabilidade genética reduz a capacidade das populações em se adaptarem a mudanças ambientais, o que as pressiona rumo à extinção. Do ponto de vista da conservação genética, a perda de uma parte da população subdividida em estruturas de famílias pode ser tão crítica quanto à perda de uma população inteira. Ao conhecer o genótipo e seus efeitos fenotípicos é possível entender como atua a seleção e quais as direções tomadas para que os seres vivos evoluam (Vencovsky, 1987; Moraes et al., 1999; Auler, 2004).

Qualquer que seja a estratégia de manejo de uma espécie é essencial que se conheça a estrutura da variabilidade genética da população ou das populações que se deseja conservar. Basicamente, duas estratégias podem ser utilizadas para estudo da estrutura da variabilidade genética de populações: estudo de caracteres quantitativos a partir do estudo de progênies e procedências e uso de marcadores moleculares. O estudo de progênies é uma estratégia muito útil quando se deseja promover a seleção de genótipos superiores para fins de melhoramento genético e também uma forma de conservação *in vivo* e *ex situ* de amostras de progênies de espécies nativas perenes. Já a utilização de marcadores moleculares apresenta como principal vantagem a facilidade de uso e a não interferência das variações ambientais. Além disso, permite o conhecimento genético de material vegetativo de plantas adultas coletadas em campo e possibilita a avaliação de grandes amostras de populações a um custo relativamente baixo e em um tempo muito menor que aquele necessário para estudos com progênies. Essa técnica mostra-se indicada para estudos que envolvem espécies ainda desconhecidas geneticamente, como é o caso da maioria das espécies nativas, por permitirem a estimativa de importantes parâmetros genéticos em curto tempo (Chaves, 2006).

Outro aspecto relevante nesse contexto é que a conservação eficiente da variabilidade genética de uma espécie depende, basicamente, da manutenção *in situ* ou *ex*

situ, de amostras com tamanho efetivo adequado. Para espécies nativas, a estrutura genética das populações interfere grandemente na representatividade das amostras. Quando ocorre alguma variação entre subpopulações, mesmo que percentualmente pequena, torna-se necessário uma amostragem de um elevado número de subpopulações para garantir um tamanho efetivo adequado. Um programa voltado para o aproveitamento de uma espécie nativa como a mangabeira poderia ganhar em eficiência ao integrar o uso de marcadores moleculares com o estudo de caracteres quantitativos a partir da avaliação de progênies e procedências. Essas duas metodologias aliadas facilitariam a definição de estratégias para coleta de sementes para estudo de progênies, para alocação de áreas de conservação *in situ*, ou para definição de um programa de manejo sustentável (Vencovsky & Crossa, 1999; Chaves, 2006).

2.5 MARCADORES MOLECULARES

2.5.1 Aspectos gerais

Marcador é todo fator morfológico, fisiológico ou genético passível de ser identificado e que permita o estudo comparativo de genótipos. Os primeiros marcadores utilizados pelos naturalistas para identificação, descrição e classificação dos seres vivos foram os morfológicos. Apesar de diferentes caracteres poderem ser utilizados como marcadores morfológicos, o efeito do ambiente, a ação gênica, a pleiotropia e epistasia são fatores que podem dificultar a sua avaliação, uma vez que a maioria está ligada a características de plantas adultas como flores, frutos e sementes. Além disso, vários alelos exibem variação contínua e um alto grau de plasticidade fenotípica. O baixo número de marcadores morfológicos diminui também a probabilidade de se encontrarem associações significativas entre estes marcadores e genes de importância econômica (Milach, 1998; Zucchi, 2002).

Com o desenvolvimento dos marcadores isoenzimáticos, seguido pelo uso de técnicas de biologia molecular, ocorreu o surgimento de métodos para detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA; assim, o número de marcadores genéticos disponíveis aumentou significativamente. As tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitiram determinar pontos de referência nos cromossomos,

tecnicamente denominados “marcadores moleculares”. Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondentemente a regiões expressas ou não do genoma). Marcadores isoenzimáticos são muitas vezes chamados de marcadores bioquímicos. A sequência de nucleotídeos e a função de um marcador molecular podem ou não ser conhecidas e, em geral, são desconhecidas. Ao se verificar o seu comportamento de acordo com as leis básicas de herança de Mendel, um marcador molecular é adicionalmente definido como marcador genético. Isto é feito, por exemplo, ao estudar o comportamento do marcador em uma população segregante (Ferreira & Gratapaglia, 1998; Milach, 1998; Faleiro, 2007).

2.5.2 Marcadores baseados em DNA

Os distintos tipos de marcadores moleculares que surgiram após as isoenzimas diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar a variabilidade no DNA, pelo polimorfismo molecular, expressão genética, distribuição no genoma, custo e operação. Podem ser classificados em dois grupos, segundo as metodologias de hibridização e a amplificação via PCR (Milach, 1998; Griffiths et al., 2006). A hibridização *in situ* é uma técnica em que se utilizam "sondas" específicas construídas a partir de nucleotídeos complementares de segmentos conhecidos do DNA ou RNA que se deseja identificar. Para permitir a visualização da reação entre as moléculas de DNA ou RNA em estudo e as sondas, estas podem ser associadas a moléculas radioativas, fluorescentes ou biotiniladas. Nos anos de 1980, foi desenvolvido por Kary Mullis uma tecnologia simples e eficiente denominada reação em cadeia da polimerase – PCR (*Polimerase Chain Reaction*). Esse processo permitiu a multiplicação *in vitro* e em escala exponencial de cópias de um segmento específico de DNA, na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR se baseia na reassociação e extensão enzimática de um par de iniciadores que delimitam a sequência de DNA de fita dupla, os iniciadores são sintetizados artificialmente e são complementares às regiões que flanqueiam a região alvo. Cada ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação com elevação da temperatura de 92°C a 95°C, anelamento, em que a temperatura é rapidamente reduzida em média para 45°C a 60°C, e extensão que ocorre quando a temperatura é elevada para 72°C. Este ciclo é repetido por várias vezes e, ao final

da reação, há uma grande quantidade de DNA de uma seqüência específica de interesse (Mullis & Faloona, 1987; Innis et al., 1990; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Existem diferentes tipos de marcadores moleculares, e cada um deles apresenta suas vantagens e desvantagens. A escolha do tipo de marcador molecular a ser utilizado em determinado estudo depende, entre outros fatores, do objetivo do estudo, da infra-estrutura disponível, dos recursos financeiros, da disponibilidade de recursos humanos com treinamento apropriado e do nível de conhecimento da genética molecular da espécie a ser estudada. Entre as vantagens dos marcadores cita-se a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente, a possibilidade de detecção em qualquer estágio do desenvolvimento da planta ou a partir de cultura de células ou tecidos e a possibilidade de gerar maior quantidade de informação genética por loco. Estes diferentes tipos de marcadores moleculares permitem estudos de evolução, de diversidade genética inter e intra-específica, de identidade, origem genética e identificação de novas variantes, e gera informações importantes para subsidiar diferentes ações de pesquisa desde a coleta até a utilização dos recursos genéticos em programas de melhoramento. Para estudos populacionais atualmente são muito usados os marcadores co-dominantes por fornecer informações que dão subsídios para entender a dinâmica evolutiva das espécies e, auxiliar na adoção de estratégias de conservação, melhoramento genético e manejo de populações naturais (Faleiro, 2007).

2.5.3 Marcadores microsatélites

Marcadores Moleculares Microsatélites, também conhecidos por SSR (*Simple Sequence Repeat* ou Repetições de Seqüências Simples), STMS (*Sequence Tagged Microsatellites* ou Sítios de Seqüências Marcadas), STR (*Short Tandem Repeats* ou Repetições Curtas em Tandem) ou SSLP (*Single Sequence Length Polymorphisms* ou Polimorfismo no Comprimento de Seqüências Simples), correspondem a repetições em tandem de 1-6 pares de bases (Eppelen et al., 1982, Hamada et al., 1982; Goldstein & Schlotterer, 1999). Os microsatélites foram inicialmente estudados no genoma humano (Hamada et al., 1982; Litt & Luty, 1989) e posteriormente, foram identificados em diferentes espécies: camundongo (Love et al., 1990); rato (Serikawa et al., 1992); porco (Moran, 1993), aves (Cheng & Crittenden, 1994); peixe (Estoup et al., 1993), insetos

(Tautz & Ranz, 1984), levedura (Tautz & Ranz, 1984) e procariotos (Sreenu et al., 2003). Foram descritos em plantas pela primeira vez por Condit & Hubbell (1991), que detectaram a presença das repetições (AC)_n e (AG)_n. Morgante & Oliveieri (1993) constataram em 34 espécies vegetais a presença de microssatélites, em que o dinucleotídeo AT foi o elemento repetido mais comum. Entretanto tem-se observado uma grande quantidade de microssatélites constituídos por repetições GA e GT em diversas espécies de plantas. As repetições CA são bem menos frequentes em plantas que em animais.

Em plantas, os microssatélites estão preferencialmente associados a regiões transcritas do genoma, especialmente as regiões não traduzidas. A implicação direta da diferença na localização de microssatélites é que a mutação que ocorre em MICROSSATÉLITE não codantes geralmente são consideradas evolutivamente neutras, enquanto que as que ocorrem em regiões codantes, podem levar a alterações na função da proteína sintetizada. As sequências repetitivas mais numerosas variam entre as espécies e, até dentro de um mesmo organismo. Em seres humanos observa-se uma maior proporção de dinucleotídeos com repetições do tipo AC/TG, enquanto que em espécies vegetais, em ordem decrescente, as repetições AT/TA, AG/TC e AC/TG são as mais numerosas. Em regiões codantes, por sua vez, a maior frequência de microssatélites corresponde a repetições de trinucleotídeos, em que essa abundância parece ser derivada de um processo de seleção negativa contra mutações que alteram a fase de leitura em regiões codantes e favorece assim, a presença de repetição em trinca (Morgante et al., 2002; Ellegren, 2004).

Essas sequências são altamente variáveis em virtude da diferença no número de unidades que se repetem: mononucleotídica; dinucleotídica; trinucleotídica; tetranucleotídica; pentanucleotídica; hexanucleotídica. Os microssatélites são classificados conforme a composição das sequências repetidas: (a) repetições perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção, por exemplo: GTGTGTGTGTGTGT; (b) repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases que não correspondem ao motivo, por exemplo: GTGTGTGTAGTGTGTT; (c) repetições compostas, quando duas ou mais repetições (classes) de microssatélites estão dispostas adjacentes, por exemplo: GTGTGTGTGTGTGCACACACACACA (Tautz, 1989; Goldstein & Schlotterer, 1999).

Estudos apontam para o *slippage*, ou o deslizamento da polimerase, como principal mecanismo relacionado ao surgimento e amplificação destas sequências repetitivas nos genomas, que geram alta taxa de mutação dos microssatélites, numa frequência de 10^{-3} e 10^{-4} por loco por gameta em cada geração (Figura 2.9).

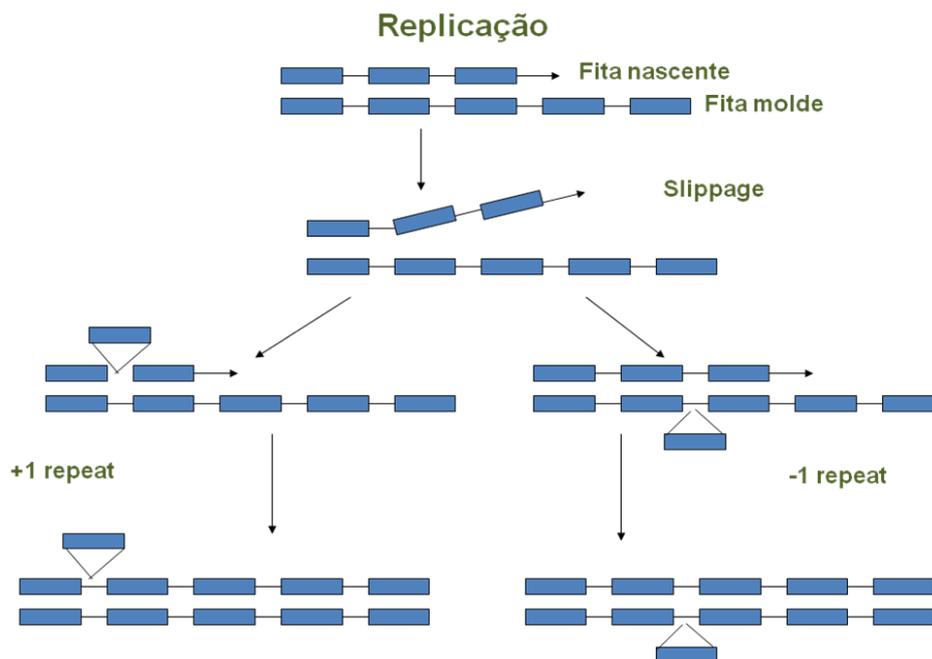


Figura 2.9 Representação do *slippage*, ou o deslizamento da polimerase, principal mecanismo relacionado ao surgimento e amplificação dos microssatélites nos genomas.

Acredita-se que durante a replicação de uma região repetitiva, as fitas de DNA separam-se e une-se novamente de forma incorreta. Isso geraria alelos com diferentes tamanhos ou números de repetições de um determinado motivo no próximo ciclo de replicação, por meio da inserção ou deleção de uma unidade de repetição. Outro fator que também pode estar associado é sistema de reparo pela DNA polimerase ou ainda, o processo de recombinação. Nesse último caso, o *crossing-over* desigual pode ser responsável pela alta taxa de polimorfismo destes marcadores, que por problemas no pareamento dessas seqüências durante o quiasma, aumenta a taxa de mutação das regiões microssatélites e são estas mutações que tornam estes marcadores tão informativos. Esses motivos repetidos são flanqueados por outras seqüências supostamente únicas no genoma e conservadas entre indivíduos da mesma espécie e até entre espécies relacionadas (Figura 2.10). Essas seqüências únicas servem como molde para a síntese de oligonucleotídeos (iniciadores) que representam seqüências de bases de DNA, com tamanho que variam de 18 a 30 pb. Assim, como o número de unidades repetidas em tandem em um microssatélite pode ser variável entre genótipos, os produtos de amplificação dos diferentes indivíduos mostrarão um polimorfismo no tamanho do fragmento amplificado. Os iniciadores (*primers*) são considerados relativamente “grandes” para a reação de amplificação via

PCR, o que torna o processo altamente específico. Essa especificidade é obtida com o aumento da temperatura de anelamento do iniciador com o DNA-alvo (Goldstein & Schlotterer, 1999).

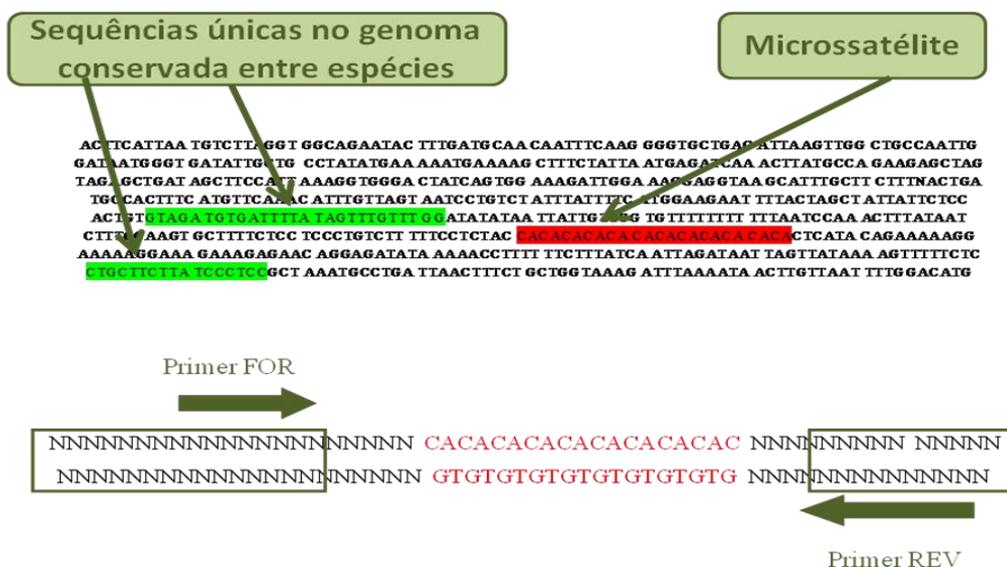


Figura 2.10 Representação esquemática da especificidade dos iniciadores desenhados a partir dos microssatélites- a seqüências únicas dos microssatélites servem como molde para a síntese de oligonucleotídeos (iniciadores).

O emprego da tecnologia dos microssatélites envolve algumas limitações, como número de etapas necessárias para o desenvolvimento de iniciadores específicos para os locos de microssatélites de cada espécie. Estas seqüências podem ser obtidas inicialmente, embora em pequeno número e apenas para algumas espécies, por meio de buscas em bancos de dados de seqüências de base, uma vez que ocorre conservação de sítios microssatélites entre espécies relacionadas. Entretanto, a obtenção de um conjunto completo de microssatélites para uma espécie somente é possível através de um programa de desenvolvimento de microssatélites. Diversos métodos são usados para o desenvolvimento desses iniciadores e envolvem a construção de bibliotecas de pequenos insertos, hibridização, seqüenciamento, desenho de iniciadores, e amplificação dos locos marcadores. Um refinamento dessa metodologia foi obtido com a utilização de enriquecimento de clones de DNA genômico com seqüências microssatélites, com o objetivo de reduzir o número de clones de uma biblioteca a ser avaliada. Essas metodologias usam o princípio de isolamento de seqüências microssatélites, por meio da utilização de oligonucleotídeos marcados com biotina, que posteriormente são acoplados a

simultaneamente a detecção da variabilidade em microssatélites e propuseram que os mesmos poderiam ser fonte importante de marcadores polimórficos de DNA, o que proporcionou sua utilização em diversos tipos de estudos populacionais e avaliam desde indivíduos até espécies proximamente relacionadas. Para a visualização dos produtos da amplificação, é necessário empregar-se um sistema de identificação do polimorfismo que seja de alta resolução. Géis desnaturantes de poliacrilamida proporcionam resolução suficiente para detectar-se diferenças de tamanho tão pequeno quanto um único par de bases. Entretanto, para a visualização dos fragmentos amplificados nestes géis, é necessário empregar-se marcação radioativa (ou um sistema baseado em quimioluminescência) do fragmento ou coloração do gel com prata. Ambos os procedimentos adicionam um grande trabalho ao processo necessário a detecção do polimorfismo, encarecendo-o e reduzindo sobremaneira a velocidade de aquisição dos dados. Um sistema alternativo para a detecção do polimorfismo em gel de poliacrilamida é a marcação dos produtos amplificados com compostos fluorescentes. Sua análise é então efetuada em um seqüenciador automático que detecta fluorescência, o que levará a uma extrema acurácia na determinação do tamanho dos fragmentos. Além disso, este sistema leva a fácil automatização da genotipagem através da eficiente aquisição, análise e armazenamento dos dados. No entanto não havendo a disponibilidade de um seqüenciador automático, sempre que o polimorfismo entre os alelos permitir, pode-se utilizar géis preparados com concentrações elevadas (3,0 a 3,5%) de agaroses especiais, cujos nomes comerciais são Nusieve, Metaphor (FMC Bioproducts) ou SFR (Amresco), os quais também possuem alto poder de resolução e podem ser corados com brometo de etídeo.

A importância dos microssatélites, no estudo genético, é que eles não exercem nenhum efeito sobre a característica avaliada. São marcadores ideais para estudos de genética e evolução de populações naturais devido ao alto poder discriminatório, à robustez, confiabilidade, praticidade operacional e por serem um dos marcadores mais informativos geneticamente, devido seu poder co-dominante. Apresentam ainda outras características altamente desejáveis: estão ampla e uniformemente distribuídos pelo genoma dos eucariotos; são altamente multialélicos; são amplificados via PCR, o que facilita sua obtenção mesmo com pouca quantidades de DNA; uma vez desenvolvidos os iniciadores que amplificam tais regiões do genoma, estes podem ser facilmente compartilhados entre laboratórios. Iniciadores marcados com fluorescência apresentam a vantagem de possibilitarem o sistema multiplex, o que permite avaliar rapidamente um

grande número de indivíduos para vários locos em pouco tempo. Se um determinado microssatélite está localizado perto de um gene funcional importante ele tende a ser herdado conjuntamente. Assim, por meio da identificação do microssatélite há uma boa chance de identificar os indivíduos que possuem o gene desejável (Ferreira & Gratapaglia, 1998; Goldstein & Schlotterer, 1999; Brondani et al., 2007).

3 DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES PARA A ESPÉCIE *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae).

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a construção de iniciadores para fins de estudos populacionais de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) a partir do desenvolvimento de bibliotecas enriquecidas com motivo de repetições de região microssatélite. Foram isolados e sequenciados as regiões que continham repetições do tipo microssatélites, o que resultou no desenho de 74 pares de iniciadores. Destes, 35 pares de sequências foram selecionados para síntese e otimização da amplificação via PCR. Todos os iniciadores sintetizados amplificaram, com temperatura de anelamento que variou de 48°C a 64°C. Foram avaliados 35 indivíduos de diferentes áreas geográficas. Foi observado elevado número de alelos por loco com média igual a 8,82 com o mínimo de quatro e máximo de 33 alelos. A heterozigosidade esperada foi igual a 0,78. Os marcadores desenvolvidos nesse trabalho foram, portanto, altamente informativos, com alto índice de polimorfismo e representam uma ferramenta adequada para ser utilizada em estudos de estrutura genética de populações naturais.

Palavras-Chave: SSR, Cerrado, biblioteca genômica.

DEVELOPMENT OF THE MOLECULAR MARKERS MICROSSATELITES FOR
Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae).

ABSTRACT

This work aimed at the construction of primers for the purpose of population studies of mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) from the development of enriched libraries with reason of microsatellite region repetitions. Regions containing microsatellite type replicates were isolated and sequenced, which resulted in the design of 74 primer pairs. Of these, 35 pairs of sequences were selected for synthesis and optimization of PCR amplification. All the synthesized primers amplified, with annealing temperature ranging from 48 ° C to 64 ° C. Thirty-five individuals from different geographic areas were evaluated. It was observed a high number of alleles per locus with an average of 8.82 with a minimum of four and a maximum of 33 alleles. The expected heterozygosity was 0.78. The markers developed in this work were therefore highly informative, with a high index of polymorphism and represent a suitable tool to be used in genetic structure studies of natural populations.

Key words: SSR, Cerrado, genomic library.

3.1 INTRODUÇÃO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma árvore frutífera, laticífera, pertencente à família Apocynaceae, encontrada em várias regiões do Brasil, desde os Tabuleiros Costeiros e Baixada Litorânea do Nordeste até o Cerrado das regiões Centro-Oeste, Norte, Nordeste e Sudeste. Apresenta potencial agroindustrial e destaca-se pelo sabor de seus frutos, que são muito apreciados e, por isso, facilmente comercializáveis. A polpa do fruto pode ser consumida *in natura* ou na forma de sorvetes, doces, geléias, licores, compotas, refrescos, vinho e vinagre (Silva-Júnior & Léo, 2006; Espíndola, 2006). O conhecimento da estrutura genética da espécie resultaria em grande impacto em programas de conservação e manejo, uma vez que esta cultura é explorada de forma extrativista o que pode resultar em acelerado processo de erosão genética (Chaves, 2006).

Marcadores moleculares do tipo microssatélites destacam-se como importante ferramenta na caracterização populacional de espécies naturais, devido ao alto poder discriminatório, à robustez, confiabilidade e praticidade operacional. As seqüências microssatélites variam muito de um indivíduo para o outro, mas as seqüências de DNA que as flanqueiam são conservadas entre indivíduos da mesma espécie. Isso possibilita a construção de iniciadores específicos para essas regiões adjacentes às seqüências microssatélites e permite a amplificação via PCR dos fragmentos que contêm o DNA repetitivo em diferentes genótipos (Goldstein & Schlotterer, 1999).

O emprego da tecnologia para o isolamento de regiões microssatélites envolve algumas limitações, tais como o número de etapas necessárias para o desenvolvimento dos iniciadores específicos para os locos de regiões microssatélites, que demandam uma estrutura laboratorial adequada e mão-de-obra especializada. Para a construção de bibliotecas genômicas enriquecidas, a hibridização dos fragmentos de DNA com sondas marcadas com biotina e selecionadas por imãs, ainda é um dos métodos mais utilizados e envolve etapas como: digestão com enzimas de restrição, recuperação do DNA (fragmentos), ligação a adaptadores, enriquecimento por meio de sondas biotiniladas, recuperação dos fragmentos com contas magnéticas (*beads*), PCR dos fragmentos enriquecidos, clonagem dos fragmentos em plasmídios, identificação de clones positivos,

busca de regiões que contenham microssatélites, desenho dos iniciadores e a triagem e caracterização dos locos microssatélites (Brondani et al., 2007).

Apesar dos significativos avanços obtidos no desenvolvimento de marcadores microssatélites nos últimos anos, para a grande maioria das espécies vegetais não existem marcadores publicamente disponíveis, como é o caso da espécie *H. speciosa*. No Brasil, já foram desenvolvidos iniciadores para várias espécies florestais como, por exemplo, eucalipto (Brondani & Brondani, 1998), palmito (Gaiotto et al., 2000), copaíba (Ciampi et al., 2000), mogno (Lemes et al., 2002), maçaranduba (Azevedo et al., 2007) e macaúba (Nucci, 2007). Em relação a espécies nativas do Cerrado ainda há poucos estudos que envolvam construção de marcadores microssatélites. Dentre as espécies frutíferas nativas contempladas estão o pequi (Collevatti et al., 1999), cagaita (Zucchi et al., 2003), araticum (Pereira, 2007), lobeira (Zelandi, 2007) e baru (Soares, 2009).

No intuito de gerar ferramentas para o conhecimento da estrutura genética da *H. speciosa*, o objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento de iniciadores que flanqueiam regiões microssatélite a partir de uma biblioteca genômica enriquecida com motivos de repetição tipo microssatélites poli (AG/TC) para a referida espécie.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de acordo com protocolo CTAB 2%, descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998). Foram realizadas adaptações na tentativa de eliminar o excesso de polissacarídeos que se associam as moléculas de DNA. Para tanto foi acrescentado ao tampão de extração 1,5% de β -mercaptoetanol e 5% de PVPP. Após a incubação a 65°C por 45 minutos, foi realizada lavagem com CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1), seguida de precipitação do DNA com álcool isopropílico. Após a precipitação, o DNA foi submetido à lavagem com NaCl a 1 M. O DNA foi novamente precipitado e submetido a lavagem com etanol 70% (2X), seguido da lavagem com etanol absoluto (1X) (Figura 3.1). A quantificação do DNA extraído foi realizada a partir de eletroforese em gel de agarose a 1%. O gel foi corado com brometo de etídio à concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ por 15 minutos. A

quantificação das bandas de DNA reveladas no gel de agarose foi realizada a partir da comparação visual com o DNA Fago λ .

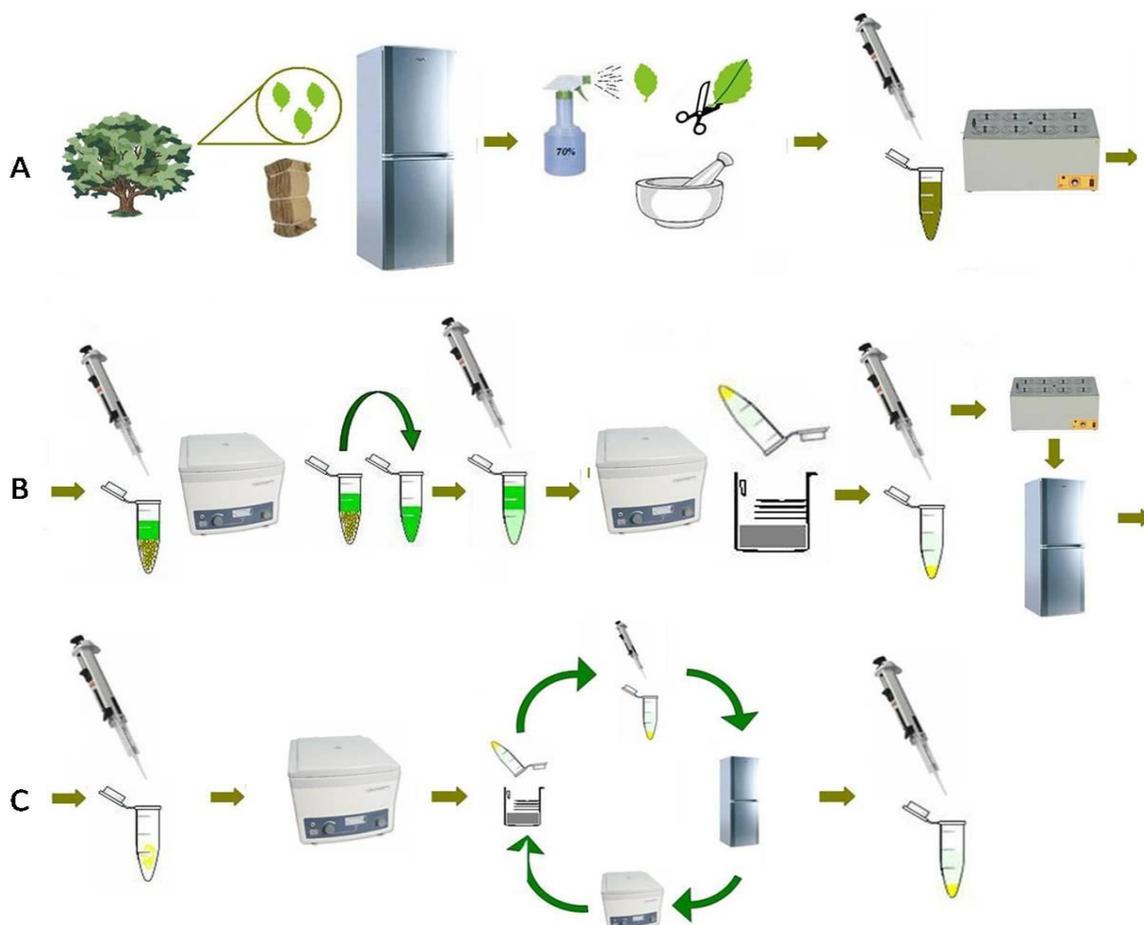


Figura 3.1: Etapas do processo de extração de DNA. A) Coleta e armazenamento de folhas. Limpeza e liofilização das folhas na presença de nitrogênio líquido em cadinho de porcelana. Acréscimo de tampão de extração ao macerado e submissão das amostras ao banho-maria. B) Desproteção com CIA, seguido de lavagem com sal. C) Lavagem com etanol 70% (2X), seguido da lavagem com etanol absoluto (1X). Fonte: Almeida Júnior (2008).

3.2.2 Isolamento e Caracterização de Marcadores Microssatélites

3.2.2.1 Construção de biblioteca genômica enriquecida com microssatélites

Para a construção da biblioteca genômica foram coletadas folhas de uma mangabeira (variedade botânica H. s. var. *gardneri*), escolhida ao acaso, localizada no arboreto da EA/UFG. A construção da biblioteca genômica foi desenvolvida no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília/DF), segundo protocolo descrito por Rafalski et al. (1996). A digestão do DNA

genômico foi testada com 3 enzimas: *Sal3AI* (GATC), *MseI* (TAA) e *TspI* 509 (AATT). Foram utilizados cerca de 50 µg de DNA genômico e 250 U de *TspI*, em tampão NE Buffer I. A reação foi incubada a 65°C por 12 horas, e posteriormente visualizada em gel de agarose 2%. Foi utilizado o marcador de peso molecular DNA *Ladder* 1kb. A eletroforese foi mantida a 100 V por 2 horas para a separação de fragmentos de DNA. Os fragmentos de 200-800 pb foram recuperados com o uso do kit *Quiaquick Gel Extraction kit* (QIAGEN) e quantificado em gel de agarose a 2%, com visualização em luz UV e brometo de etídeo. A enzima *TspI* 509 foi a mais eficiente e portanto selecionada para a construção da biblioteca genômica. Cerca de 5 µg dos fragmentos de DNA foram ligados a 200 µmol de adaptadores da enzima *TspI*, constituídos dos oligonucleotídeos denominados “long” (5’ AATTGGAATTCGACTCGCAGCAGCC 3’) e “short” (5’ GGCTGCTGCGAGTCGAATTCC 3’), em uma reação composta de 3 U de T4 DNA ligase (*Amershan Pharmacia Biotech*), incubada a 12°C por 12 horas (Figura 3.2).

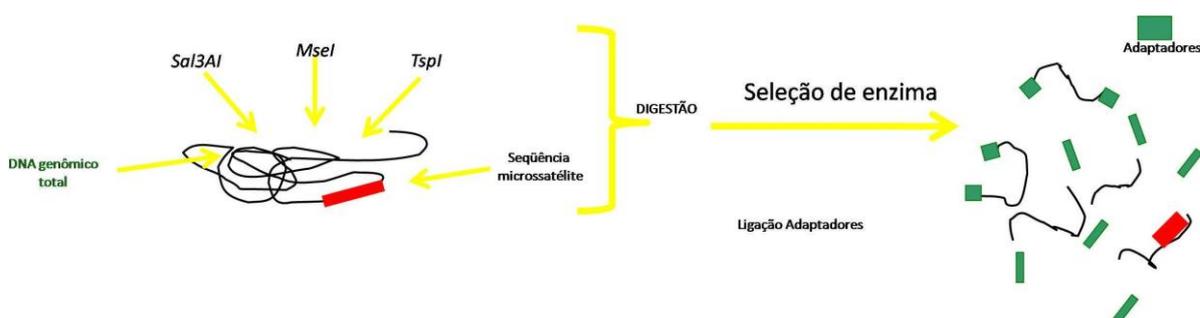


Figura 3.2: Digestão do DNA genômico com enzimas de restrição e ligação dos fragmentos digeridos a adaptadores.

O enriquecimento da biblioteca para regiões com as repetições desejadas foi realizado por meio da hibridização dos fragmentos com uma sonda (TC)₁₃ ligada com biotina. Este complexo liga à avidina contida nas *beads* paramagnéticas (*Dynabeads*). Os oligonucleotídeos poli-AG/TC foram ligados à biotina por meio de uma reação composta de: tampão da terminal transferase, 50 nmol de biotina 16 dUTP, 200 pmol de (TC)₁₃ e 26,5 U de terminal transferase. A reação foi incubada em banho-maria a 37°C por 30 minutos e a enzima foi inativada com EDTA (2M). A precipitação foi feita em 2,5 volumes de etanol absolutos por 12 horas, seguida por 30 minutos de centrifugação, lavagem com etanol 70% e resuspensão com 30 µL de água ultrapura. Para hibridização, um mg de contas magnéticas (*Dynabeads – Streptavidina Bohering Mannheim*) a 10 µg/µL foram lavadas com 400 µL de tampão PBS + 1% BSA (*Phosphate-Buffered Saline – Bovine*

Serum Albumin). Em seguida, as contas magnéticas foram separadas com o auxílio de uma estante magnética e a solução aquosa sobrenadante removida. As contas foram lavadas com 400 µL de B&W (*Binding & Washing Buffer*) 1x e o sobrenadante novamente retirado como supracitado. Em seguida, foram adicionados 200 µL de B&W 2x, 170 µL de água MiliQ e 30 µL de Bio-oligos (biotina + oligos TC₁₃). A solução permaneceu sob agitação por uma hora em temperatura ambiente para que houvesse a hibridização da biotina com as contas magnéticas. As contas ligadas aos Bio-oligos foram novamente precipitadas, o sobrenadante retirado e o complexo lavado 2x com 400 µL de B&W 1x e uma vez com 400 µL de SSC (Standard Saline Citrate) 5x + SDS 0.1%. Para resssuspende o complexo Bio-oligo-contas, foram adicionados 150 µL de SSC 10x + SDS 0,2% pré-aquecido a 65°C. A solução foi incubada a 65°C por 15 minutos e armazenada a 4°C. Para hibridização, foi adicionado 0,5 volume de água ultrapura ao complexo DNA-adaptador, desnaturado a 95°C por 15 minutos. Em seguida, foram preparados sete tubos para lavagens da solução com o objetivo de retirar excessos de reagentes que não se complexaram. No primeiro tubo (controle) foram adicionados 100 µL de água ultrapura, mais 1 µL de DNA+adaptador. À solução de DNA+adaptador foi adicionado o complexo Bio-oligos-contas, incubado a 65°C por 90 minutos para que ocorresse a hibridização dos fragmentos de DNA que continham sequência de microssatélites complementares aos oligos TC₁₃. O complexo foi precipitado com auxílio de uma estante magnética e o sobrenadante colocado em um segundo tubo. Novamente o complexo foi lavado 2x por 15 minutos com 400 µL de SSC 2x + SDS 0,1% (tampão que desfaz a ligação entre o DNA e as *beads*). O sobrenadante de cada lavagem foi transferido pra os outros tubos (3 a 6) e o complexo foi ressuspendido em 200 µL de água ultrapura (tubo7). Foi feita uma reação de PCR com os sete tubos das lavagens para controle do enriquecimento da biblioteca e determinar se houve perda de DNA durante o processo das lavagens. A reação continha um volume final de 25 µL composta por: 2,0 µL do produto da hibridização; tampão (1mM Tris-HCl, pH 8,3; 5mM KCl); 1,5 mM de MgCl₂; 1 mM de cada um dos iniciadores complementares às seqüência dos adaptadores; 0,25 mM dNTP; 1 U de Taq DNA polimerase e água ultrapura. O programa de amplificação via PCR foi ajustado no termociclador para: 95°C por 3 minutos, 20 ciclos de 94°C por 45 segundos, 56°C por 45 segundos, 72°C por 2 minutos e extensão final de 72°C por 7 minutos. Como não houve um enriquecimento satisfatório da biblioteca, foi feito um re-enriquecimento com o uso da sonda (TC)₁₃. Assim, foram realizadas novamente todas as etapas do enriquecimento

(enriquecimento com sondas biotiniladas (TC)13, recuperação dos fragmentos com contas magnéticas (beads); lavagens para purificação) e por fim realizada a PCR com os sete tubos das lavagens para controle do reenriquecimento da biblioteca e determinar se houve perda de DNA durante o processo das lavagens, o que resultou um resultado satisfatório (Figura 3.3).

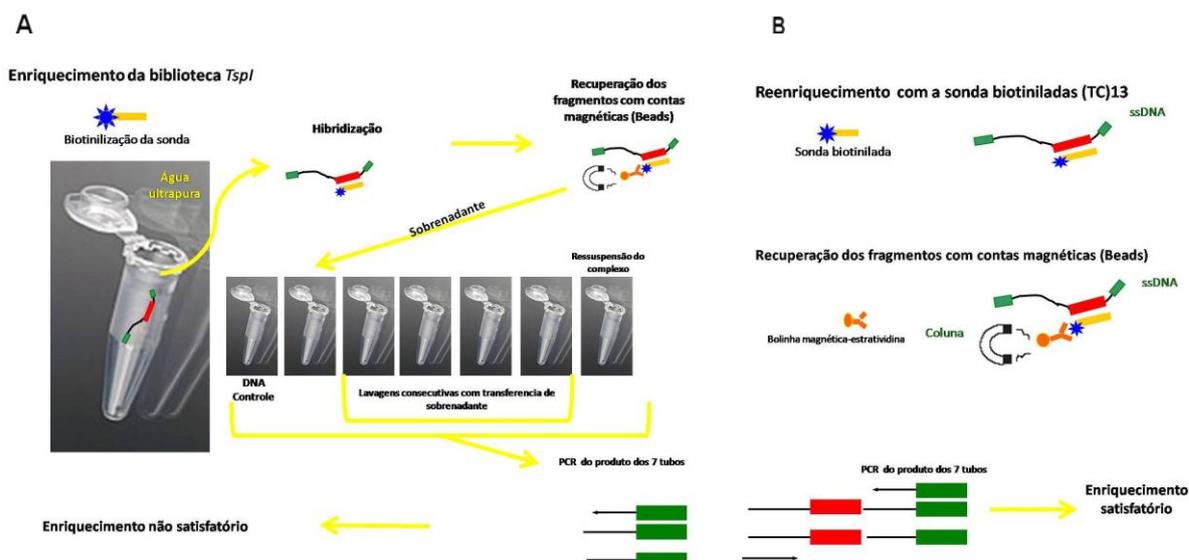


Figura 3.3: Etapas do enriquecimento (A) e reenriquecimento (B) da biblioteca genômica por meio de sondas biotiniladas, recuperação dos fragmentos com contas magnéticas (*beads*), Amplificação dos fragmentos enriquecidos.

Após a purificação foi feita uma ligação do DNA de mangaba purificado, ao vetor pGEM-T *Easy Vector* (*Promega Corp*), com o uso da seguinte reação de ligação: 400 ng de DNA, tampão T4 DNA ligase, 3 U de T4 DNA ligase, 5 ng de pGEM-T e água ultrapura, incubada por 12 horas a 4°C. Para a transformação, foram usadas células competentes de *Escherichia coli* (cepa XL1 – Blue) pelo método de eletroporação. Foram utilizadas 2 µL da reação de ligação, 2 µL de água ultrapura e 50 µL de células competentes armazenadas a -80°C. A eletroporação foi feita a 1,8 V e em seguida foram adicionados 950 µL do meio SOC e realizada a incubação por 1,5 horas a 37°C sob agitação. Placas de petri com meio de cultura LB_{AMP} (ampicilina a 50 µg/mL), 40 µL de X-gal (40 µg/ µL), 16 µL de IPTG (0,5 M) foram inoculadas com a cultura de células transformadas e incubadas a 37°C por 12 horas. A seleção dos clones positivos foi feita diretamente baseada na atividade do gene da β-galactosidase. As colônias de cor branca (recombinantes) não produzem uma enzima funcional que cliva a molécula de X-gal. Já os clones não recombinantes produzem a enzima funcional e são capazes de degradar o X-gal,

tornando as colônias azuis. Cada colônia branca foi repicada em placa de petri contendo meio LB_{AMP} (Figura 3.4).

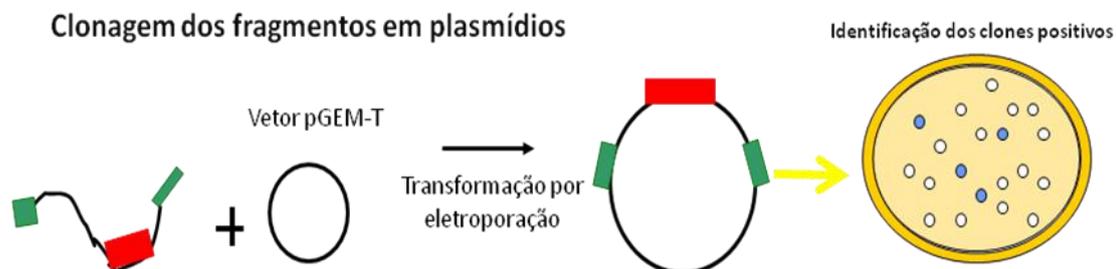


Figura 3.4: Esquema da ligação do DNA purificado, ao vetor pGEM-T *Easy Vector* (*Promega Corp*) e identificação dos clones positivos.

3.2.2.2 Sequenciamento de clones positivos, análise das sequências e desenho dos iniciadores

Uma vez identificados, os clones positivos (colônias brancas) foram subculturados em meio LB líquido para obtenção de DNA molde dos plasmídeos com o inserto que continha microssatélite. Um μL da subcultura foi diluído em 80 μL de água ultrapura e desnaturado a 95°C por 5 minutos. Esta mistura foi utilizada como molde nas reações de PCR prévias às reações de sequenciamento, as quais foram realizadas com o uso dos iniciadores *forward* e *reverse* M13 complementares à região do vetor. As reações de amplificação via PCR foram ajustadas para um volume final de 10 μL e continham 2 μL de DNA template; 1x de tampão PCR 10x; 0,75 μM de cada um dos iniciadores M13 (*forward* e *reverse*); 0,35 mM de dNTP; 1,3 U de Taq DNA polimerase e água ultrapura. O programa do termociclador se constituiu de 95°C por 5 minutos, 20 ciclos (94°C por 1 minuto; 58°C por 1 minuto, 72°C por um minuto) e uma extensão final de 72°C por 7 minutos. A verificação dos produtos de PCR foi realizada em gel de agarose 2%, para seleção dos fragmentos para o sequenciamento. O produto da reação foi purificado com o uso de *Exonuclease I* and *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Exo-SAP). Foram usados 5 μl do produto da PCR e 2 μl do Mix Exo-Sap [0,25 U de Exonuclease I. (10 U/ μl) e 0,25 U de SAP (1 U/ μl)]. Esse procedimento foi usado somente para fragmentos amplificados de vetor. Antes de adicionar as enzimas à reação, as mesmas foram diluídas em Tampão de diluição da SAP (Tris 50 mM pH 8,0) para a concentração final de 0,25 U/ μl , e em seguida adicionou-se à reação 1 μl de cada. Foi usado 1 μl com 100 ng do DNA purificado ou, dependendo da quantificação, para o sequenciamento. As reações de sequenciamento

ocorreram a partir da tecnologia *Big Dye Terminator* versões 2.0 e 3.0 (*Applied Biosystems*). Foram utilizados na reação 100 ng de DNA molde, 0,5 μ M de iniciador M13 (*forward* e *reverse*), 4 μ L de pré-mix *Big Dye-Terminator* v.3.0 e água ultrapura. O controle utilizado foi o DNA do plasmídeo M13. O programa da reação de sequenciamento em termociclador 9600 (*Applied Biosystems*) foi: 96°C por 3 minutos, 25 ciclos (96°C por 20 segundos, 50°C por 20 segundos, 60°C por 4 minutos) seguidos de uma extensão final de 60°C por 5 minutos e mantida a 4°C até sua utilização. O sequenciamento foi realizado em um analisador de fragmentos ABI-377 (*Perkin Elmer*). Após a seleção das colônias que continham os fragmentos clonados na etapa anterior, foi feita a extração plasmidial (miniprep) pelo método de lise alcalina. Em seguida os clones foram sequenciados com o uso de *Big Dye Terminator* com o iniciador M13 (*forward* ou *reverse*). A amplificação ocorreu a partir do programa: 96°C por 2 minutos, seguidas de 25 ciclos (96°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos, 60°C por 4 minutos) e um passo final a 4°C. A reação foi purificada e a sequência de cada clone selecionado foi determinada pela análise em um sequenciador semi-automático 3100 (*Applied Biosystem*). As regiões que continham os microssatélites foram analisadas de acordo com a qualidade das regiões flanqueadoras e das sequências repetitivas. Pares de iniciadores específicos para a amplificação destas regiões foram desenhados a partir do *software primer3* (Rozen & Skaletsky, 2000). Para o desenho dos iniciadores foram utilizados como critérios: tamanho do oligonucleotídeo (iniciador) que variou entre 18 e 27 nucleotídeos, temperatura de anelamento com variação entre 52°C e 64°C, diferença de temperatura de anelamento máxima entre os componentes do par de iniciadores de 3°C, conteúdo GC com variação entre 40% e 60% e não complementariedade entre os componentes do par de iniciadores. Para identificar e localizar sequência simples repetitivas, ou microssatélites, foram utilizados os programas *Tandem Repeats Finder* (Benson, 1999) e *Repeat Masker*, que localizam as sequências repetitivas que tenham um comprimento igual ou superior a 18 pb. Todas as sequências foram analisadas quanto à sua qualidade a partir do programa *phred* (Ewing & Green, 1998; Ewing et al., 1998). Foram aceitas sequência com pelo menos 150 nucleotídeos, com a exclusão do vetor, com qualidade *phred* maior ou igual a 20. Foi feito o alinhamento de todas as sequência a partir dos programas *BioEdit* versão 5.0.0 (Hall, 2001) e *Clustal X* (Thompson et al., 1997) (Figura 3.5).

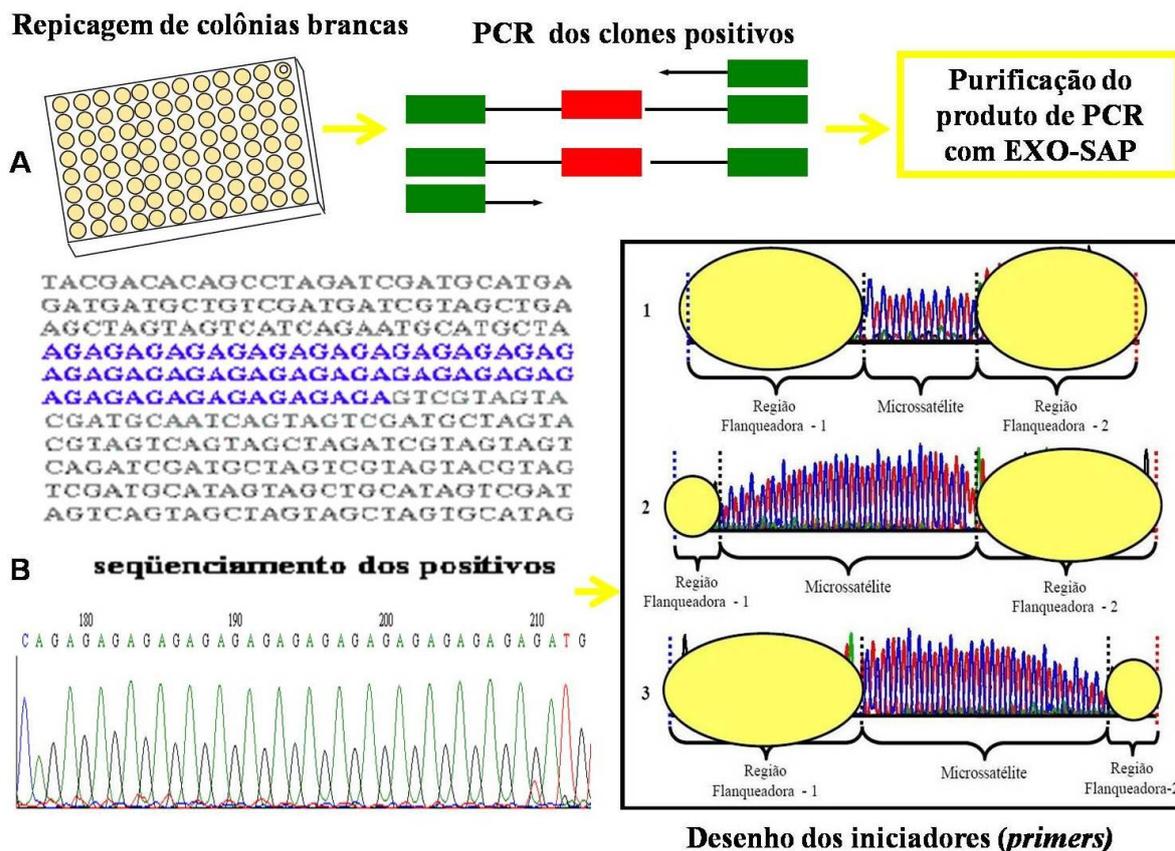


Figura 3.5: Amplificação e seqüenciamento dos clones positivos e desenho dos iniciadores. A: repicagem, amplificação e purificação dos clones positivos. B: seqüenciamento dos clones positivos e desenho dos iniciadores.

3.2.2.3 Padronização das condições de amplificação para os iniciadores

A padronização das condições de amplificação foi realizada no Laboratório de Genética Vegetal da EA/UFG (Goiânia, GO). Foram selecionados 35 dos 74 pares de iniciadores, construídos a partir da biblioteca enriquecida com microsatélites, para a síntese e otimização. Inicialmente foi estabelecida a concentração ideal de DNA a ser usadas nas amplificações via PCR. No caso da mangabeira esse fato é relevante em função da baixa quantidade de DNA extraído em alguns indivíduos. Foram realizados também testes para estabelecer as concentrações dos reagentes usados nas amplificações via PCR.

Os 35 pares de iniciadores sintetizados foram submetidos a uma temperatura de anelamento igual a 54°C de modo a verificar o padrão de amplificação. Nessa etapa foram escolhidos seis indivíduos ao acaso de mangabeiras pertencentes ao arboreto da EA/UFG. A partir daí realizou-se ajustes na temperatura de anelamento a fim de melhorar a reprodutibilidade e intensidade das bandas geradas, bem como a especificidade de cada par

de iniciador. Aqueles iniciadores que não amplificaram ou apresentaram padrão de amplificação ruim, tiveram sua temperatura de anelamento reduzida. Já aqueles que apresentaram melhor padrão de amplificação, porém, com presença de bandas inespecíficas, foram submetidos a um aumento de temperatura de anelamento. Para verificar os produtos de amplificação utilizou-se a eletroforese em géis de agarose 3,5% nos testes iniciais e posteriormente a eletroforese em géis de acrilamida 6%, corados com prata, segundo Creste et al., 2001.

Ao observar os produtos de amplificação das PCR nos géis de poliacrilamida, detectou-se a presença de bandas inespecíficas decorrentes do excesso de iniciador e $MgCl_2$. Assim, foram realizados ajustes para concentrações desses reagentes, seguido de adequação da temperatura de anelamento às novas concentrações dos reagentes. Por fim as condições de amplificação foram ajustadas para um volume final de 25 μL por reação composta por 10 ng de DNA genômico, 1X de tampão; 1,5 mM $MgCl_2$; 0,4 mM dNTPs; 0,1 μM de cada iniciador e 1U de *Taq* DNA polimerase (Figura 3.3). As amplificações ocorreram no termociclador modelo PTC-100 (*MJ Research Inc.*) em microplacas de 96 slots, ajustado para 30 ciclos com a seguinte programação: desnaturação: 94 °C por 1 minuto; anelamento: variação de temperatura conforme o iniciador testado; alongação: 72 °C por 1 minuto. Foi acrescentado ao programa uma etapa inicial de 94 °C por 5 minutos e uma etapa final de 72 °C por 7 minutos.

Para caracterização dos locos microssatélites, foram avaliadas 35 plantas (Tabela 3.1) pertencentes à coleção de germoplasma da espécie na EA/UFG (Anexo A). Foram escolhidos indivíduos oriundos de áreas geográficas distintas a fim de detectar o máximo de variabilidade genética possível, que contempla a representação de quatro variedades botânicas: *H. speciosa* var. *speciosa* (*H. s.* var. *speciosa*), *H. speciosa* var. *cuyabensis* Malme (*H. s.* var. *cuyabensis*), *H. speciosa* var. *gardneri* (A. DC.) Muell. Arg. (*H. s.* var. *gardneri*), *H. speciosa* var. *pubescens* (Nees. e Martius) Muell. Arg. (*H. s.* var. *pubescens*). Após a coleta, as plantas foram marcadas em campo e catalogadas em um mapa de controle. A localização e a distância geográfica das matrizes que originaram a coleção do banco de germoplasma foram determinadas, a partir das coordenadas geográficas e a altitude (m) pelo Sistema de Posicionamento Global – GPS (Figura 3.6). As folhas coletadas foram posteriormente estocadas a -20° C.

Tabela 3.1. Localidades de coleta, coordenadas geográficas e variedades das plantas de mangabeira da coleção da EA/UFG, utilizadas para caracterização dos locos microssatélites. **Latitude (S), Longitude (O), Altitude (m).**

Indivíduos por município de coleta					
Planta	Município - Estado	(S)	(O)	(m)	Variedade botânica
1	Barro Alto – GO	14°46,157'	49°03,497'	549	<i>H. s. var. pubescens</i>
2	Barro Alto – GO	14°46,079'	49°03,509'	544	<i>H. s. var. gardneri</i>
3	Campinorte – GO	14°16,790'	49°13,602'	434	<i>H. s. var. pubescens</i>
4	Porangatu – GO	13°04,917'	49°11,351'	347	<i>H. s. var. gardneri</i>
5	Jalapão – TO	10°34,870'	46°48,968'	469	<i>H. s. var. speciosa</i>
6	Mateiro – TO	10°24,503'	46°29,562'	491	<i>H. s. var. speciosa</i>
7	Dianópolis - TO	11°02,970'	46°33,569'	656	<i>H. s. var. speciosa</i>
8	São Desidério - BA	12°33,002'	45°55,217'	811	<i>H. s. var. speciosa</i>
9	Alvorada do Norte - GO	14°30,746'	46°32,988'	551	<i>H. s. var. gardneri</i>
10	Alexânia – GO	16°12,756'	48°24,500'	970	<i>H. s. var. pubescens</i>
11	Matrinchã - GO	15°12,472'	50°55,184'	376	<i>H. s. var. gardneri</i>
12	Goiás – GO	15°59,146'	50°06,202'	583	<i>H. s. var. gardneri</i>
13	Silvânia – GO	16°34,349'	48°21,734'	951	<i>H. s. var. gardneri</i>
14	Luziânia – GO	16°43,081'	48°05,093'	941	<i>H. s. var. gardneri</i>
15	Goiânia – GO	16°35,994'	49°16,77'	729	<i>H. s. var. pubescens</i>
16	Goiânia – GO	16°35,994'	49°16,77'	729	<i>H. s. var. gardneri</i>
17	Pirenópolis - GO	15° 48 332'	48° 52,674'	1303	<i>H. s. var. gardneri</i>
18	Piranhas – GO	16°27,618'	51°42,494'	498	<i>H. s. var. gardneri</i>
19	Barra do Garças - MT	15°51,259'	52°11,948'	509	<i>H. s. var. gardneri</i>
20	General Carneiro - MT	15°35,853'	53°09,640'	484	<i>H. s. var. gardneri</i>
21	Chapada dos Guimarães - MT	15°30,741'	55°18,629'	745	<i>H. s. var. cuyabensis</i>
22	Jaciara – MT	15°48,403'	55°15,960'	810	<i>H. s. var. cuyabensis</i>
23	Rondonópolis- MT	16°44,743'	54°38,935'	537	<i>H. s. var. cuyabensis</i>
24	Sonora – MS	17°49,688'	54°43,358'	459	<i>H. s. var. gardneri</i>
25	Coxim – MS	18°35,161'	54°46,144'	256	<i>H. s. var. gardneri</i>
26	Alcinópolis - MS	18°14,744'	53°59,150'	348	<i>H. s. var. gardneri</i>
27	Costa Rica - MS	18°23,604'	53°20,270'	735	<i>H. s. var. gardneri</i>
28	Chapadão do Sul - MS	18°36,58'	53°00,259'	787	<i>H. s. var. gardneri</i>
29	Caçu – GO	18°33,316'	51°08,102'	467	<i>H. s. var. gardneri</i>
30	Niquelândia - GO	14° 22,510'	48° 45,010'	600	Var. botânica não definida
31	Japonvar – MG	15° 56,400'	44° 13,720'	900	Var. botânica não definida
32	Ponte Alta – TO	10°38,987'	47°26,533'	380	<i>H. s. var. speciosa</i>
33	Posse – GO	14°06,833'	46°18,821'	811	<i>H. s. var. speciosa</i>
34	Araguapaz - GO	15°20,163'	50°37,937'	375	<i>H. s. var. gardneri</i>
35	Orizona – GO	16°45,845'	48°12,665'	841	<i>H. s. var. gardneri</i>
Indivíduos por variedade botânica					
Variedade botânica		Número de indivíduos			
<i>H. s. var. pubescens</i>		4			
<i>H. s. var. gardneri</i>		20			
<i>H. s. var. cuyabensis</i>		3			
<i>H. s. var. speciosa</i>		6			

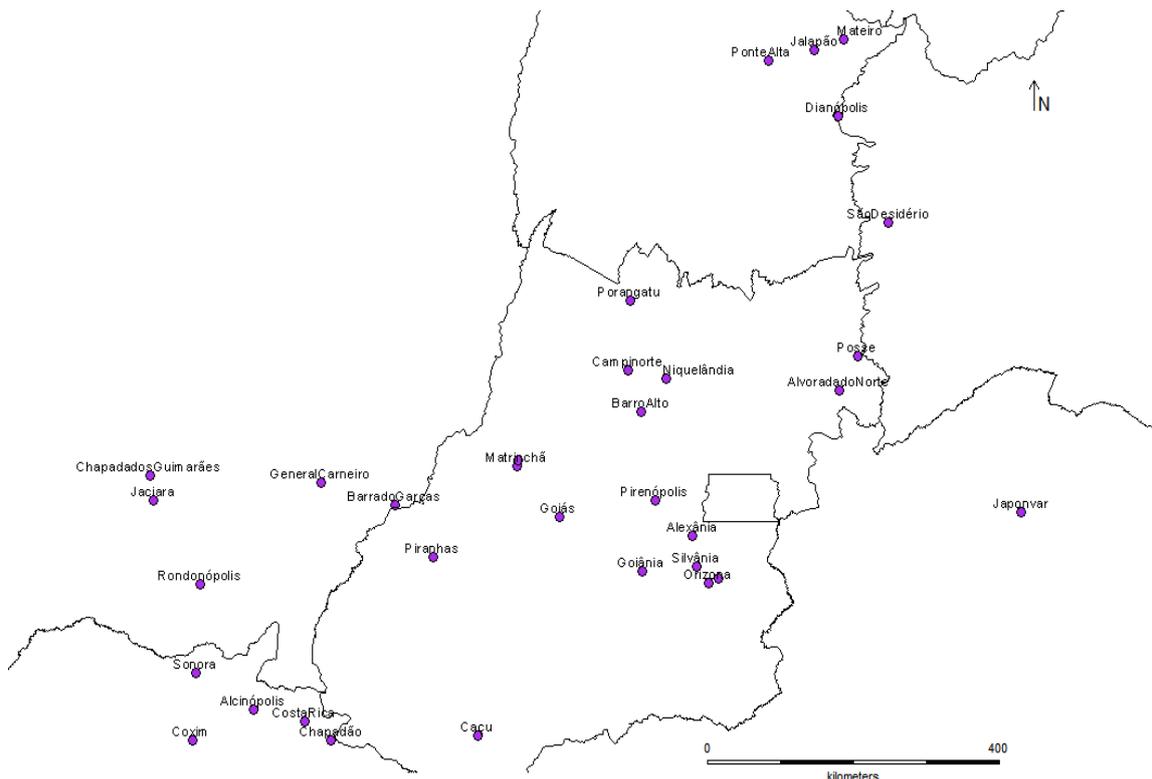


Figura 3.6. Mapa das localidades de coleta das matrizes de mangabeira do Cerrado representadas na coleção da EA/UFG.

3.2.3 Análise estatístico-genética

As frequências alélicas e genotípicas em cada um dos locos foram obtidas a partir da leitura dos dados nos géis, feita sobre luz branca. Os fragmentos visualizados foram estimados em pares de base, por comparação com DNA padrão de peso molecular conhecido (“ladder” 10 bp - Invitrogen® com amplitude entre 10 bp a 330 bp e “ladder” 100 bp - Invitrogen® com amplitude entre 100 bp a 2.072 bp). As bandas que apresentaram mesma mobilidade foram consideradas idênticas, a presença de banda única foi considerada como alelos em homozigose e alelos nulos não foram considerados para as análises. Os dados coletados foram organizados em planilhas e convertidos para os formatos exigidos para as análises computacionais. Os parâmetros genéticos de diversidade foram obtidos pelo programa GDA. Foram estimados: o número médio de alelos por loco (A); a heterozigidade esperada sob condições do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e), heterozigidade observada (H_o) e índice de fixação (f).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Eficiência da biblioteca genômica enriquecida, sequenciamento de clones positivos e desenho dos iniciadores

O desenvolvimento da biblioteca enriquecida com locos microssatélites foi eficiente na identificação de locos microssatélites para a espécie *Hancornia speciosa*. Das enzimas testadas a mais eficiente foi a *TspI* que gerou o melhor padrão de fragmentos digeridos (200 pb a 800 pb). Foram selecionados 1056 clones positivos, os quais tiveram os insertos com MICROSSATÉLITE amplificados via PCR (Figura 3.7).

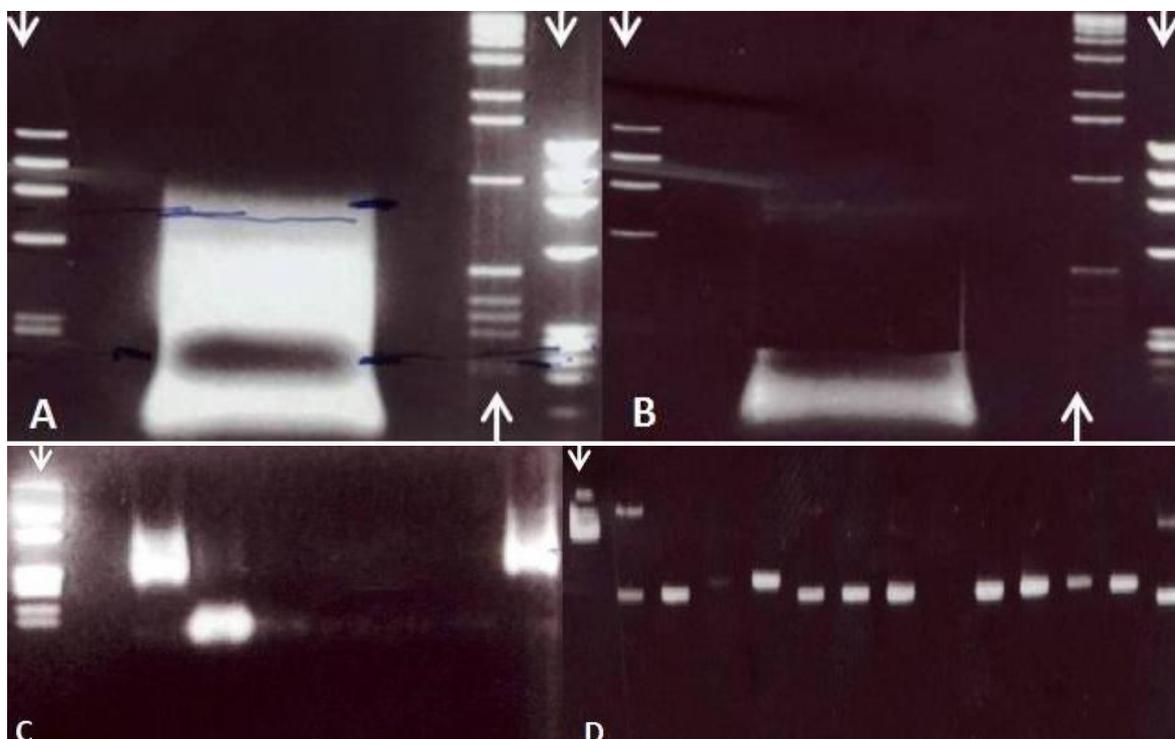


Figura 3.7: Eficiência da digestão com a enzima *TspI509*; controle do enriquecimento e seleção de fragmentos para seqüenciamento. A) Digestão com a enzima *TspI509* - fragmentos gerados (200-800 pb). B) Visualização após a recuperação dos fragmentos. C: Resultado da reação de amplificação dos produtos obtidos na etapa de reenriquecimento com os sete tubos das lavagens. D: quantificação da reação de amplificação - pré-reação de sequenciamento. As setas indicam Marcadores de peso molecular?. Gel de agarose a 2%.

Dos 1056 clones positivos, 576 fragmentos foram seqüenciados e 74 seqüências permitiram o desenho de iniciadores na região conservativa com diferentes composições, tamanhos e motivos de repetição (Tabela 3.2). Os demais clones não se mostraram satisfatórios para o desenho de iniciadores uma vez que não atendiam a pelo

menos um dos critérios pré-fixados. Assim foram descartadas sequências com repetições muito curtas, sequências muito próxima aos adaptadores ou com conteúdo GC abaixo de 40% nas regiões flanqueadoras. Foram descartados ainda microssatélites imperfeitos ou com baixa qualidade das sequências obtidas nas regiões flanqueadoras.

Tabela 3.2: Relação das 74 sequencias obtidas a partir da biblioteca enriquecida com microssatélites para espécie *Hancornia speciosa*.

Iniciador	Sequencia dos iniciadores (forward e reverse – 5' → 3')	Motivo	Frag. Esp. (pb)	Classificação
HS 01	F: CGTTGGTAGCGGCTGTATTAAG R: CCCTCCTGCCACTCTCT	(AG)11 (GA)14	120	COMPOSTO
HS 02	F: GTGTCTTCCATCCGAGCTTAAC R: TTTCCAGAAAGGAGAGGTACA	(GCA)6 (TC)20 (GCA)8	275	COMPOSTO
HS03	F: AATTCAACCCCTTCTGCGAATC R: CACCAGGAACGATCAGGAAG	(CT)14	169	PERFEITO
HS 04	F: CACTCTCTCTCAGCATTTCCT R: TGCATAGAAGGAGAAGAAGAAGC	(CT)5 (CT)6	158	COMPOSTO
HS 05	F: GCGAGTCGAATTCCAATTACTC R: AAAGTCCAGTAATAGCGCCAAA	(AG)17	247	PERFEITO
HS 06	F: CCGCTATACACCCACATGC R: GTACCAGGGACGAGTTGGG	(CT)23 (TC)5 (AC)6	174	COMPOSTO
HS 07	F: GGGTGTACTGCCACAAGGTACT R: GTGTCTTCCATCCGAGCTTAAC	(GA)15 (TGC)6	177	COMPOSTO
HS 08	F: CGGCTGTATTAAGTCTATTGCCA R: CCCTGCCACTCTCTTTTCC	(GA)14	107	PERFEITO
HS 09	F: AAACGACTCCACCTCTCTTGTC R: AGGGCCTTCTTCCCCTCT	(GA)6 (GA)13	125	COMPOSTO
HS 10	F: CGTCGCAACACACATACACATA R: CGAATTCCAATTGCAGGTTT	(TC)7 (CA)5 (CA)6	198	COMPOSTO
HS 11	F: TCCAATTCCAGACCCGATA R: AAGCTCCTCTCAAGTATGTTCTGT	(GA)18	114	PERFEITO
HS 12	F: CCACCACTACAAACGTTACACAC R: CACTAGGAACGATCGGGAAG	(TC)11	142	PERFEITO
HS 13	F: GAGCAGGAGTCAGGAAAATCAC R: GAAGAAGGGAGAAGGGAAGC	(TC)14 (CT)11 (TC)6	243	COMPOSTO
HS 14	F: TCAAAACAGTTGCATCTCCAATC R: AGTGAGAGAGTAAACGCCGAAC	(CT)14	237	PERFEITO
HS 15	F: ACTCACACAAAGCTCACACACC R: AGTAATCAGTTCGGGGAGGT	(CT)6 (TC)5 (CA)6	261	COMPOSTO
HS 16	F: AATGTAGAGGTGAACGAGTGGG R: TACACCCTGCTCATCGTTTATG	(CA)6 (CT)17	248	COMPOSTO
HS 17	F: TGCAAACCCCTCGTTTATTTCTT R: ATFGTGTGTGTGTGTGTGGG	(CT)7 (CT)10 (CT)6	262	COMPOSTO
HS 18	F: TCATTTGTCATGAAATCCGTGT R: AGTGTCTGTCCTACTGAAGGGG	(AG)5 (AG)14	208	COMPOSTO
HS 19	F: GGGGAAGAAGGGAGAAGGG R: CCTCCGACCGCTTCATTG	(AG)10	152	PERFEITO
HS 20	F: CCTTTATATAGACGCGCCAGAC R: AAGAAGAGAAAAGCGGACATCAG	(GA)14 (AG)5	202	COMPOSTO
HS 21	F: CCTCCAACCTCAACTCTCTC R: GTTTTCTCAAAGTCTTCCGTG	(TC)11	105	PERFEITO
HS 22	F: ACAAATCAATGAGGAGGTGCTT R: TAACTATGTGCAACCGCAAGAC	(CT)14 (CT)8	135	COMPOSTO
HS 23	F: GTGATATTTCTGCTCTCCAAG R: CTCTGCCACTGTGCAACC	(GA)17	106	PERFEITO
HS 24	F: AAGGTATCTCCATGAAAGTCTCTGA R: TTCAATGTCTTCGCACTCTCT	(GA)9	107	PERFEITO
HS 25	F: AAGAAGAGAAAAGCGGACATCAG R: CCTAGAAAAGCCAGCGACG	(TC)11	114	PERFEITO
HS 26	F: CAAACCCTCGTTCCTCTCTCT R: GATGTCGCAACTCGAGCA	(CT)22	214	PERFEITO
HS 27	F: ATTTTGGAGCAGGAGTCAGGAA R: CAATGAAGCGGTCCGAGG	(TC)14	145	PERFEITO
HS 28	F: AGTATAATAGTGACACCTTCAAATCC R: AACACCGAGCACAAACAC	(AG)9	100	PERFEITO

HS 29	F: AATTATGCTGCACTCCGCTC R: GAGAAGAGAAGGGAGGGGATAA	(CT)13	209	PERFEITO
HS 30	F: CTGGGGTACTTCAGCAAATCAC R: CATCAAAGACCGTTGTCTCCTT	(CT)12	101	PERFEITO
HS 31	F: GAGCAGGAGTCAGGAAAATCAC R: ACAGTGAAGGGGCAATGAAG	(TC)14	126	PERFEITO
HS 32	F: GGCTGGGCTACTCCTTTTCTAT R: CAAATCGGGAAGACGAAGG	(CT)13	123	PERFEITO
HS 33	F: GTGAGTGTTGTGCGTGTGTGT R: CTTCTTCTTCTCTCGCGGT	(GA)16	214	PERFEITO
HS 34	F: GAGCAGGAGTCAGGAAAATCAC R: ACACGCAGAGAGAGATGCATAG	(CT)16 (CT)10 (CT)5	218	COMPOSTO
HS 35	F: CGTTGGTAGCGGCTGTATTAAG R: CCCCTCTGCCACTCTCT	(GA)12	114	PERFEITO
HS 36	F: CGTTGGTAGCGGCTGTATTAAG R: GCCACTCTCTTTCCCGATT	(AG)23	130	PERFEITO
HS 37	F: ACTCGAGCAGAAGAAGCAAATC R: ACACACCCATCAGCCC	(GA)16	116	PERFEITO
HS 38	F: TAGCTAGATTGACACCACAGCA R: TCCTGCTCTCACTATTTGTGG	(AG)18	278	PERFEITO
HS 39	F: ACACGCAGAGAGAGATGCATAGA R: ATTTCCCTCCGACCGCTT	(GA)6 (AG)5	157	COMPOSTO
HS 40	F: GATGTCGCAACTCGAGCA R: GCGCACATAACCCACACAC	(AG)17	124	PERFEITO
HS 41	F: ACAGAAATCATGCACAGTCACC R: GTCTCTGCCTACTCCCTGTTGT	(GA)12	181	PERFEITO
HS 42	F: ATTCATGCTCCACTGGCTTC R: GACCACAGCTAGTGACGTGTTT	(AG)14	207	PERFEITO
HS 43	F: ATTCTGCAAACCCCTCATTTT R: AAAGAGAGAGTGTGTGTGCG	(TTC)5 (GCC)6	109	COMPOSTO
HS 44	F: CACTCTCTCTCAGCATTTCCTT R: AAGAAGGGAGAAGGGGAAGCA	(CT)6 (CT)6	164	COMPOSTO
HS 45	F: CTAACCCACTACAACCTCTGGGC R: ATCCGATTTAGGACATTGGGT	(CT)11	140	PERFEITO
HS 46	F: GATTGTGTGTGGTGTGTGTGG R: CCCTCGTTCTTCTCTTCTTCTT	(AG)13	207	PERFEITO
HS 47	F: TTCCCATCTCTCATCTCTCTCC R: GTTCTTGCTGCTGTTGTTGCT	(CA)5 (CT)18 (TC)5 (AC)5	250	COMPOSTO
HS 48	F: GGACGAAACGAAATGGAGAGTA R: AGTAAAGACACGTCATCCCCAC	(GA)12	160	PERFEITO
HS 49	F: GAATCATAGCAAAGTGTGCTG R: CACATACACTCACACCATCG	(TG)5 (AG)7 (TG)5	149	COMPOSTO
HS 50	F: AATGTAGAGGTGAACGAGTGGG R: TCCAATTCAATGCAAATACACC	(CA)6 (CT)8	212	COMPOSTO
HS 51	F: TGCAAACCCCTATTCTTTTCTTC R: GGAGCAAATCGGGAAGCC	(CGC)6	134	PERFEITO
HS 52	F: ACGTCTGCTTACTCAATCTACC R: GTGATCAGACCATAAAACAAAA	(CT)17	123	PERFEITO
HS 53	F: TCATGACTTGCACCAGCC R: CAAACGTTACACACGCAG	(GA)6 (AG)9	126	COMPOSTO
HS 54	F: GCTAAATCAAGCAAACCTCGAC R: AAAGCAGTCCATGATCCATTTT	(AG)12	152	PERFEITO
HS 55	F: CACGGCTGTCTGTGCTTG R: ACTCGAGCAGAAGAAGCAAATC	(TC)11	118	PERFEITO
HS 56	F: ATTGATGTGACTGTGTTGGGTG R: ATTCCAATTTTCTGCAAACCG	(GT)6 (AG)10	202	COMPOSTO
HS 57	F: CAAACAAGCTTTATGTGGGTCA R: AGCTCAAGGAAGTGGGATCTAA	(CT)10	172	PERFEITO
HS 58	F: GTGCTACTCTCTTCTTCCGC R: AGTGAAGGGGCAATGAAGC	(TC)14	100	PERFEITO
HS 59	F: CCCAGACTTACCAGAAGCATTT R: GGAATTCGATTGGCTGCT	(CT)12	220	PERFEITO
HS 60	F: TATAGTGGTCCCTGCACCCTTGT R: TTTCCCTTGTGCTTCGC	(GA)14	128	PERFEITO
HS 61	F: TCTATTGGAGTGTTCCTCAC R: AGATTCAAGAGAAAACGGAAAA	(CT)15	129	PERFEITO
HS 62	F: ATTGTGTGTGTGTGTGTGGG R: TTTATTTCTTCTTTCCTTCGC	(AG)7 (AG)16	244	COMPOSTO
HS 63	F: GTGAGCTTGTGCTACTCTCCCT R: TTGTCACCGTGTCTAGCAGT	(CT)15	178	PERFEITO
HS 64	F: GAGGAATCTCAGCCAAGTCCTA R: CCCAGCCTTACAACTCTCTG	(AG)10	169	PERFEITO

HS 65	F: TGTGTTGTGTGAGTGTGTGGAT R: CTCCCGATTCTCACTGGT	(TG)5 (TG)5	107	COMPOSTO
HS 66	F: GCGCACACATACTCACACAGA R: TCTGTGCATTCTTTTATGCGA	(CA)6 (AC)5	100	COMPOSTO
HS 67	F: GTCGATCCGATTTAGGACATTG R: GCACACACCCACACTCCA	(AG)19	176	PERFEITO
HS 68	F: CTTTTCTGCAACCCTCATCTT R: ACTCGAGCTGAGAAAACGAATC	(CT)9	185	PERFEITO
HS 69	F: CGTTGGTAGCGGCTGTATTAAG R: CACTCTCTTTCCCGATTTCC	(AG)24	132	PERFEITO
HS 70	F: TTGAAGATTTTCGTGTGTA R: AGTATAATAGTGACTCCTTGAAA	(CT)12	116	PERFEITO
HS 71	F: CATAGAAGGAGCAGAAGAAGCG R: CAGCATTTCCCTCCGACC	(AG)10	118	PERFEITO
HS 72	F: GCATCTTGAGAAGAAAGAGGGA R: TGTAGATGGAATCTTGCCACTG	(TGG)5	144	PERFEITO
HS 73	F: GCAGAGAGAGATGCATAGAAGGA R: CACGTGAGTTCGTGCTACTCTC	(GA)5 (AG)8 (GA)14	229	COMPOSTO
HS 74	F: GAATAGACCCACGTCAACAACA R: GGACGAAACGAAATGGAGAGTA	(CT)13	219	PERFEITO

Os iniciadores desenhados possuem entre 18 pb e 24 pb de comprimento. Dos motivos microssatélites desenhados, 47 são perfeitos e 27 são compostos. Segundo Harr et al., (2000), o processo de *slippage* do DNA, responsável pela origem de novos alelos dentro dos microssatélites, também pode remover as interrupções dos microssatélites imperfeitos, o que aumenta a frequência dos perfeitos. Foram observados 94% de regiões contendo motivos dinucleotídeos (TG/AC, CA/GT, TC/AG, CT/GA) e seis% de trinucleotídeos (GCA, TGC, TTC, GCC, CGC, TGG) (Figura 3.8). A ocorrência de di ou tri nucleotídeos foi decorrente da sonda (TC)₁₃ usada no enriquecimento da biblioteca genômica.

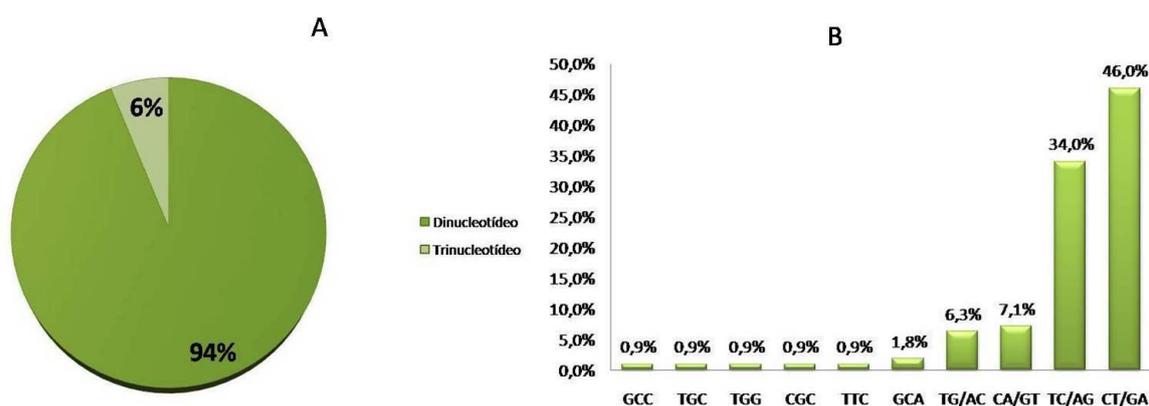


Figura 3.8: Motivos microssatélites encontrados nas 74 sequências de iniciadores desenhados a partir da biblioteca *TspI*. A) Frequência dos motivos quanto ao número de unidades que se repetem. B) Frequência dos tipos de motivos.

3.3.2 Caracterização dos iniciadores construídos a partir da biblioteca

Dos 74 pares de iniciadores desenhados, 35 pares foram selecionadas para a síntese e otimização. A seleção baseou-se em critérios relacionados ao conteúdo do motivo. Os dinucleotídeos são os motivos que normalmente exibem maior polimorfismo na análise de locos e por isso foram preferencialmente escolhidos. A seleção de trinucleotídeos se deu na tentativa de se obter maior cobertura do genoma. As sequências mononucleotídicas, tendem a formar *stutters* (sombras de bandas com uma repetição a mais ou a menos no alelo), um dos principais complicadores da análise de microssatélites. Microssatélites tri, tetra e pentanucleotídicos apresentam menor *stutter*, ou pelo menos é mais fácil distinguir alelos de *stutter* nestes e, por consequência, seus alelos parecem ter uma melhor definição, facilitam a análise, aumentam a eficiência na distinção de indivíduos e a redução em erros de genotipagem. Porém, os motivos tetra e pentanucleotídeos tendem a fornecer baixo polimorfismo, o que não os torna muito interessante em análises genéticas (Morgante *et al.*, 2002). As condições de amplificação, para os 35 pares de iniciadores sintetizados, foram padronizadas satisfatoriamente (Figura 3.9).

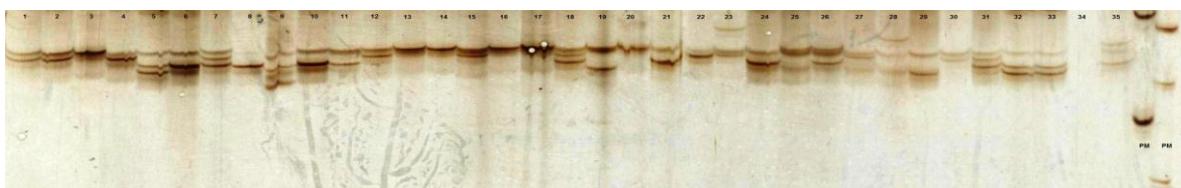


Figura 3.9. Perfil dos fragmentos gerados a partir das reações de amplificação via PCR, com o iniciador HS26, com 35 indivíduos. Acrilamida 6%, corado com prata.

A temperatura de anelamento dos 35 iniciadores selecionados para a amplificação específica de cada loco microssatélite variou entre 48°C e 64°C (Figura 3.10). A maioria dos iniciadores apresentou temperatura de anelamento igual a 56°C. Esse é um dado importante uma vez que iniciadores com a mesma temperatura possibilitam montagens de sistemas multiplex, em que vários locos são analisados simultaneamente a partir de uma única reação de PCR ou de PCR independentes, seguidas em uma única eletroforese.

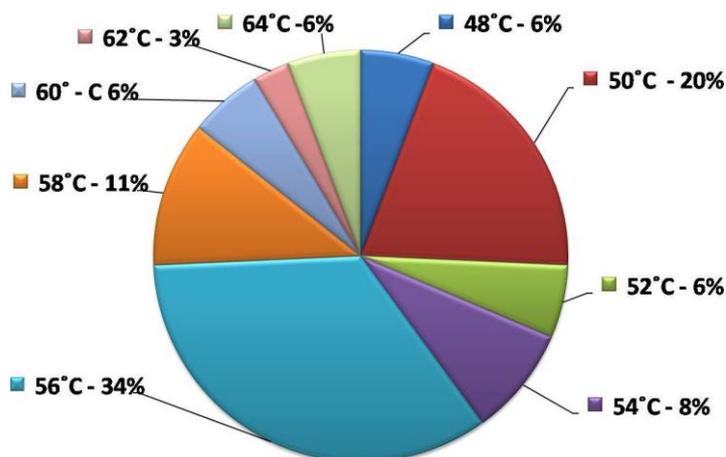


Figura 3.10. Variação da temperatura de anelamento específica obtida a partir da amplificação dos 35 iniciadores otimizados.

O tamanho dos fragmentos gerados variou entre 80 pb e 450 pb (Tabela 3.3). Todos os locos avaliados revelaram polimorfismo. O número de alelos observado foi elevado, o que é esperado para locos microssatélites que são multialélicos (Goldstein & Schlötterer, 1999). A média de alelos por loco foi de 8,82 ao considerar todos os 35 indivíduos como pertencentes de uma única população (Tabela 3.3). O loco que apresentou maior número de alelos foi o HS35 (33 alelos). Os locos HS02, HS19 e HS34 foram os que apresentaram o menor número de alelos (quatro alelos por loco). A heterozigidade esperada (H_e), considerando o conjunto de indivíduos, foi de 0,78. A maior heterozigidade esperada foi verificada no loco HS35 (0,94) e a menor (0,62) no loco HS15. Este parâmetro pode ser tomado como uma medida do potencial informativo do loco, em análises genéticas, uma vez que reflete em diversidade genética e permite uma discriminação individual precisa para estudos populacionais da espécie

Tabela 3.3: Relação dos 35 pares de iniciadores sintetizado e caracterizados para espécie *Hancornia speciosa*.

Iniciador	Motivo	Sequencia dos iniciadores (forward e reverse – 5' → 3')		Frag. Esp. (pb)	Frag. Obt. (pb)	Tanel (oC)	A	He
HS 01	(GCA) ₆ (TC) ₂₀ (GCA) ₈	F:	GTGTCTTCCATCCGAGCTTAAC	275	250 a 310	50	13	0,89
		R:	TTTCCAGAAAGGAGAGGTACA					
HS 02	(CT) ₁₄	F:	AATTCAACCTTCTGCGAATC	169	80 a 150	50	4	0,68
		R:	CACCAGGAACGATCAGGAAG					
HS 03	(CT) ₅ (CT) ₆	F:	CACTCTCTCAGCATTCCCT	158	120 a 180	58	7	0,81
		R:	TGCATAGAAGGAGAAGAAGAAGC					
HS 04	(AG) ₁₇	F:	GCGAGTCGAATTCCAATTACTC	247	80 a 200	54	13	0,84
		R:	AAAGTCCAGTAATAGCGCCAAA					
HS 05	(GA) ₁₅ (TGC) ₆	F:	GGGTGTACTGCCACAAGGTACT	177	200 a 300	58	7	0,73
		R:	GTGTCTTCCATCCGAGCTTAAC					
HS 06	(GA) ₁₄	F:	CGGCTGTATTAAGTCTATTGCCA	107	100 a 150	50	7	0,75
		R:	CCCTGCCACTCTCTTTTCC					
HS 07	(CT) ₆ (TC) ₅ (CA) ₆	F:	ACTCACACAAAGCTCACACACC	261	220 a 260	56	5	0,69
		R:	AGGTAATCAGTTCTGGGGAGGT					
HS 08	(CA) ₆ (CT) ₁₇	F:	AATGTAGAGGTGAACGAGTGGG	248	200 a 250	48	12	0,89
		R:	TACACCCTGCTCATCGTTATG					
HS 09	(CT) ₇ (CT) ₁₀ (CT) ₆	F:	TGCAAAACCTCGTTTATTCTT	262	200 a 300	64	8	0,81
		R:	ATTGTGTGTGTGTGTGTGGG					
HS 10	(CT) ₁₄ (CT) ₈	F:	ACAAATCAATGAGGAGGTGCTT	135	100 a 200	52	8	0,85
		R:	TAACATGTGCAACCGCAAGAC					
HS 11	(GA) ₁₇	F:	GTGATATTTCGTGCTCTCCAAG	106	100 a 200	50	8	0,77
		R:	CTCTGCCACTGTGCAACC					
HS 12	(CT) ₂₂	F:	CAAACCTCGTCTCTCTCTCT	214	200 a 250	56	5	0,66
		R:	GATGTCGCAACTCGAGCA					
HS 13	(CT) ₁₂	F:	CTGGGGTACTCAGCAATCAC	101	100 a 150	56	8	0,84
		R:	CATCAAAGACCGTTGCTCTCT					
HS 14	(TC) ₁₄	F:	GAGCAGGAGTCAGGAAAATCAC	126	100 a 200	56	6	0,71
		R:	ACAGTGAAGGGCAATGAAG					
HS 15	(GA) ₁₆	F:	GTGAGTGTGTGCGTGTGTGT	116	150 a 300	60	5	0,62
		R:	CTCTTCTCTCTCTCGCGGT					
HS 16	(GA) ₁₂	F:	CGTTGGTAGCGCTGTATTAAG	114	100 a 150	48	7	0,72
		R:	CCCCTCTGCCACTCTCT					
HS 17	(GA) ₁₆	F:	ACTCGAGCAGAAGAAGCAAATC	116	100 a 200	54	11	0,82
		R:	ACACACCCTCATCAGCCC					
HS 18	(AG) ₁₄	F:	ATTCATGTCTCAGTGGCTTC	207	300 a 350	50	11	0,87
		R:	GACCACAGTAGTGACGTGTTT					
HS 19	(TTC) ₅ (GCC) ₆	F:	ATTCTGCAAACCTCATTTTC	109	350 a 400	56	4	0,63
		R:	AAAGAGAGAGTGTGTGTGCG					
HS 20	(CT) ₁₁	F:	CTAACCCACTACAATCTGGGG	140	200 a 250	50	9	0,84
		R:	ATCCGATTTAGGACATTGGGT					
HS 21	(AG) ₁₃	F:	GATTGTGTGTGGTGTGTGTGG	207	200 a 300	64	7	0,76
		R:	CCCTCGTCTCTCTCTCTCTCT					
HS 22	(GA) ₁₂	F:	GGACGAACCGAAATGGAGAGTA	160	180 a 220	56	7	0,74
		R:	AGTAAAGACACGTCATCCCCAC					
HS 23	(CGC) ₆	F:	TGCAAACCTCATTTCTTTCTTC	134	180 a 250	56	9	0,84
		R:	GGAGCAAATCGGAAGCC					
HS 24	(AG) ₁₂	F:	GCTAAATCAAGCAAACCTCGAC	152	200 a 300	58	7	0,81
		R:	AAAGCAGTCCATGATCCATTT					
HS 25	(TC) ₁₁	F:	CACGGCTGTCTGTCTGTTG	118	80 a 150	56	6	0,65
		R:	ACTCGAGCAGAAGAAGCAAATC					
HS 26	(CT) ₁₀	F:	CAAACAAGCTTTATGTGGGTCA	172	200 a 300	58	9	0,80
		R:	AGCTCAAGGAAGTGGGATCTAA					
HS 27	(GA) ₁₄	F:	TATAGTGGTCTGCACCTTGT	128	100 a 150	54	20	0,94
		R:	TTTTCCCTTGTGCTTCGC					
HS 28	(CT) ₁₅	F:	TCTATTGGAGTGTTCCTCAC	129	250 a 300	56	5	0,76
		R:	AGATTCAAGAGAAAACGGAAAA					
HS 29	(CT) ₁₅	F:	GTGAGCTTGTGCTACTCTCCCT	178	300 a 400	50	6	0,68
		R:	TTGTACCGTGTCTTAGCAGT					
HS 30	(AG) ₁₀	F:	GAGGAATCTCAGCCAAGTCCTA	169	180 a 200	56	10	0,88
		R:	CCCAGCCTCTACAAACTCTCTG					
HS 31	(AG) ₁₉	F:	GTCGATCCGATTAGGACATTG	176	50 a 100	56	5	0,70
		R:	GCACACACCCACTCCA					
HS 32	(CT) ₉	F:	CTTTCTGCAACCTCATTTCT	185	200 a 300	52	14	0,90
		R:	ACTCGAGCTGAGAAAACGAATC					
HS 33	(AG) ₂₄	F:	CGTTGGTAGCGGCTGTATTAAG	132	80 a 120	56	9	0,83
		R:	CACCTCTTTTCCCGATTTTCC					
HS 34	(TGG) ₅	F:	GCATCTTGAGAAGAAAGAGGGGA	144	180 a 200	60	4	0,65
		R:	TGTAGATGGAATCTTGCCACTG					
HS 35	???	F:	GCATAGAAGGAGCAGAAGAAGC	???	250 a 300	62	33	0,95
		R:	GAGCAGGAGTCAGGAAAATCAC					
MÉDIA	-	-	-	-	-	-	8,8	0,78

Frag. Esp.: tamanho do fragmento esperado; Frag. Obt.: intervalo do fragmento obtido; Tanel: temperatura de anelamento do iniciador. A: número médio de alelos por loco; He: heteroziguidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg.

3.4 CONCLUSÕES

- ✓ A metodologia usada no desenvolvimento dos iniciadores representa eficiente ferramenta na identificação de locos microssatélites para a espécie *Hancornia speciosa*;
- ✓ Os 74 pares de iniciadores desenvolvidos apresentam diferentes composições, tamanhos e motivos de repetição;
- ✓ As condições de amplificação, para os 35 pares de iniciadores sintetizados, estão padronizadas;
- ✓ Todos os locos avaliados revelaram polimorfismo, com alto índice médio de alelos;
- ✓ O índice médio de heterozigosidade esperada foi alto, o que reflete em diversidade genética e permite uma discriminação individual precisa para estudos populacionais da espécie;
- ✓ A bateria de marcadores moleculares desenvolvidos resulta, portanto em uma ferramenta adequada para ser utilizada em estudos de caracterização genética de populações da espécie.

4- CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE PROGÊNIES DE *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) DO CERRADO

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a magnitude e a distribuição espacial da variabilidade genética em populações naturais de *H. speciosa* do Cerrado a partir de marcadores moleculares microssatélites. Foram avaliadas 162 progênies a partir de seis pares de iniciadores desenvolvidos e padronizados para a espécie. Os iniciadores utilizados revelaram alto índice de polimorfismo, com valor médio de 20,17 alelos por loco. O valor estimado de F_{ST} , ao considerar cada área geográfica como uma subpopulação foi de 0,19. Este parâmetro é um indicativo da divergência genética entre as subpopulações, o que sugere um alto nível de diferenciação e restrição ao fluxo gênico. A estimativa do parâmetro N_{ST} foi consideravelmente maior que o F_{ST} , o que confirma a grande diversidade existente entre as subpopulações de mangabeira do Cerrado. A análise de associação entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas observadas entre as subpopulações revelou a ausência de correlação significativa e confirma, para esse estudo, um padrão aleatório de distribuição espacial da variabilidade genética entre subpopulações. Ao considerar as variedades botânicas como diferentes populações, observou-se uma estimativa de 0,0583 para a estatística F_{ST} e o valor estimado de N_{ST} foi de 0,1738 o que mais uma vez indica, a maior sensibilidade deste parâmetro para detectar divergência entre populações. Na análise de estrutura genética par a par entre as variedades botânicas, observou-se uma maior semelhança genética entre *H. s. var. gardneri* e *H. s. var. pubescens*. A variedade *H. s. var. cuyabensis* mostrou-se a mais divergente em relação às demais. A população de Japonvar – MG não se agrupou com *H. s. var. speciosa* e corrobora com a hipótese de esta pertencer a outra variedade botânica, o que deve ser melhor investigado.

Palavras-Chave: Mangaba, MICROSSATÉLITE, estrutura genética.

GENETIC CHARACTERIZATION OF *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) PROGENIES FROM BRAZILIAN CERRADO

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the magnitude and spatial distribution of genetic variability in natural populations of *H. speciosa* do Cerrado from molecular markers microsatellites. Sixty-two progenies were evaluated from six pairs of primers

developed and standardized for the species. The primers used revealed a high index of polymorphism, with a mean value of 20.17 alleles per locus. The estimated value of F_{ST} , considering each geographical area as a subpopulation was 0.19. This parameter is indicative of the genetic divergence among the subpopulations, which suggests a high level of differentiation and restriction to the gene flow. The estimate of the NST parameter was considerably higher than the F_{ST} , which confirms the great diversity among the subpopulations of the Cerrado mangrove. The analysis of association between the genetic distances and the geographical distances observed between the subpopulations revealed the absence of significant correlation and confirms for this study a random pattern of spatial distribution of genetic variability among subpopulations. When considering the botanical varieties as different populations, an estimate of 0.0583 was observed for the F_{ST} statistic and the estimated NST was 0.11738, which again indicates the greater sensitivity of this parameter to detect divergence between populations. In the analysis of genetic structure par to the pair among the botanical varieties, it was observed a greater genetic similarity between *H. s. var. gardneri* and *H. s. var. pubescens*. The *H. s. var. cuyabensis* was the most divergent in relation to the others. The population of Japonvar - MG was not grouped with *H. s. var. speciosa* and corroborates with the hypothesis that this belong to another botanical variety, which should be further investigated.

Key words: Mangaba, Microsatélite, Genetic Structure.

4.1 INTRODUÇÃO

O Cerrado apresenta elevada diversidade, decorrente da variedade de ambientes. Dessa forma, os organismos estão sujeitos a diferentes pressões seletivas, o que resulta em diferenciações genéticas. Esse fato é observado na mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) que apresenta seis variedades botânicas identificadas, com diferenças marcantes na morfologia foliar e no porte da planta adulta: *H. speciosa* var. *speciosa*, *H. speciosa* var. *maximiliani* A. DC., *H. speciosa* var. *cuyabensis* Malme, *H. speciosa* var. *lundii* A. DC., *H. speciosa* var. *gardneri* (A. DC.) Muell. Arg., *H. speciosa* var. *pubescens* (Nees. e Martius) Muell. Arg. (Monachino, 1945).

Os frutos da mangabeira apresentam potencial para atividades agroindustriais e podem ser usados na produção de sucos, geléias e sorvetes. Alguns fatores, no entanto, inibem a expansão do seu cultivo, dentre eles o lento crescimento da planta até a idade reprodutiva e a forte sazonalidade. Para tornar a espécie interessante para os processos industriais, são necessários programas de melhoramento genético a partir de informações de Bancos de Germoplasma (Vieria Neto et al., 2006). A partir da preocupação com a conservação das populações naturais e necessidade de demanda por materiais melhorados, foi formada na Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal

de Goiás (EA/UFG), uma coleção *ex situ* de progênies de mangabeira do Cerrado. A caracterização genotípica dessa coleção passou a ser, portanto uma necessidade para o conhecimento e futura utilização da variabilidade disponível. A variabilidade genética é um instrumento de investigação muito importante quando se deseja verificar afinidades e limites entre as espécies, detectar modos de reprodução e estrutura familiar, estimar níveis de migração e dispersão nas populações e até mesmo para ajudar na identificação de espécies ameaçadas de extinção. A caracterização da variabilidade genética de populações naturais é também imprescindível para o melhoramento genético, uma vez que toda a seleção de genótipos superiores é baseada na diversidade genética (Chaves, 2006).

Os marcadores moleculares são locos gênicos que apresentam algum polimorfismo e podem ser recomendados para estudos de populações naturais. Marcadores moleculares co-dominantes destacam-se em estudos populacionais, dentre eles os microssatélites, que consistem em repetições em *tandem* de pequenos motivos de sequência com 1 a 6 nucleotídeos. Essas sequências apresentam uma elevada taxa de mutação, da ordem de 10^{-3} , o que resulta em uma ampla variação no número de unidades repetidas. Assim, os dados gerados por essa classe de marcadores são altamente informativos e amplamente utilizados em programas de caracterização genética de populações, em mapeamento genético e em identificação de indivíduos. Este tipo de marcador detecta padrões de estrutura de populações que dependem de forças que afetam igualmente todos os locos, tais como o fluxo gênico e deriva genética, mas também de fatores que agem diferentemente em cada loco, tais como as forças seletivas, processos de mutação e tipo de herança (Goldstein e Schlotterer, 1999).

A quantificação da composição, padrões de estrutura e distribuição da variabilidade genética em populações naturais é de suma importância para se inferir sobre a atuação dos processos microevolutivos nas espécies. Assim, com base nesse princípio, o objetivo deste trabalho foi avaliar a magnitude e a distribuição espacial da variabilidade genética em progênies de *H. speciosa* Gomes provenientes de populações naturais, a partir de marcadores moleculares microssatélites.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal

Foram coletadas folhas jovens de 162 mangabeiras, pertencentes à coleção de germoplasma da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás, que contempla a representação de progênes de 32 áreas geográficas (Tabela 4.1) e quatro variedades botânicas (Tabela 4.2): *H. speciosa* var. *speciosa* (*H. s.* var. *speciosa*), *H. speciosa* var. *cuyabensis* Malme (*H. s.* var. *cuyabensis*), *H. speciosa* var. *gardneri* (A. DC.) Muell. Arg. (*H. s.* var. *gardneri*), *H. speciosa* var. *pubescens* (Nees. e Martius) Muell. Arg. (*H. s.* var. *pubescens*). Para a maioria das progênes, instaladas em ensaio com repetições, foram genotipadas duas plantas por progênie. Após a coleta, as plantas foram marcadas em campo e catalogadas em um mapa de controle. A localização e a distância geográfica das matrizes que originaram a coleção de germoplasma foram determinadas, a partir das coordenadas geográficas e a altitude (m) pelo Sistema de Posicionamento Global – GPS (Figura 4.1). As folhas coletadas foram posteriormente estocadas a -20° C.

Tabela 4.1. Localidades, coordenadas geográficas e variedades das matrizes de mangabeira do Cerrado representadas na coleção da EA/UFG (Anexos B), em função do município de coleta.

Subpopulação	Município - Estado	Progênie	Planta	Bloco	Latitude (S)	Longitude (O)	Altitude (m)	Variedade botânica
1	Barro Alto - GO	1	1a	I	14°46,157'	49°03,497'	549	<i>H. s. var.pubescens</i>
			1b	IV	14°46,157'	49°03,497'	549	<i>H. s. var.pubescens</i>
		2	2a	I	14°46,157'	49°03,497'	549	<i>H. s. var.pubescens</i>
			2b	II	14°46,157'	49°03,497'	549	<i>H. s. var.pubescens</i>
		3	3a	I	14°46,079'	49°03,509'	544	<i>H. s. var.gardneri</i>
			3b	II	14°46,079'	49°03,509'	544	<i>H. s. var.gardneri</i>
		101*	101	IV	14°46,079'	49°03,509'	544	<i>H. s. var.gardneri</i>
		102*	102	IV	14°46,079'	49°03,509'	544	<i>H. s. var.gardneri</i>
		103*	103	IV	14°46,079'	49°03,509'	544	<i>H. s. var.gardneri</i>
		104*	104	IV	14°46,079'	49°03,509'	544	<i>H. s. var.gardneri</i>
		105*	105	IV	14°46,079'	49°03,509'	544	<i>H. s. var.gardneri</i>
106*	106	IV	14°46,079'	49°03,509'	544	<i>H. s. var.gardneri</i>		
108*	108	IV	14°46,079'	49°03,509'	544	<i>H. s. var.gardneri</i>		
109*	109	IV	14°46,079'	49°03,509'	544	<i>H. s. var.gardneri</i>		
110*	110	IV	14°46,079'	49°03,509'	544	<i>H. s. var.gardneri</i>		
2	Caminorte - GO	4	4a	I	14°16,790'	49°13,602'	434	<i>H. s. var.pubescens</i>
			4b	III	14°16,790'	49°13,602'	434	<i>H. s. var.pubescens</i>
		60	60	V	14°16,758'	49°13,599'	438	<i>H. s. var.pubescens</i>
3	Porangatu - GO	5	5a	I	13°06,162'	49°11,912'	342	<i>H. s. var.gardneri</i>
			5b	II	14°16,758'	49°13,599'	438	<i>H. s. var.gardneri</i>
		62	62	V	13°00,814'	49°09,723'	342	<i>H. s. var.gardneri</i>
4	Jalapão - TO	6	6a	I	10°30,923'	46°53,475'	444	<i>H. s. var.speciosa</i>
			6b	IV	10°30,923'	46°53,475'	444	<i>H. s. var.speciosa</i>
		7	7a	III	10°30,915'	46°53,447'	446	<i>H. s. var.speciosa</i>
			7b	IV	10°30,915'	46°53,447'	446	<i>H. s. var.speciosa</i>
		8	8	I	10°34,870'	46°48,968'	469	<i>H. s. var.speciosa</i>
9	9	IV	10°33,638'	46°46,914'	401	<i>H. s. var.speciosa</i>		
5	Mateiro - TO	10	10	I	10°24,520'	46°29,569'	491	<i>H. s. var.speciosa</i>
6	Dianópolis - TO	11	11	III	11°02,970'	46°33,569'	656	<i>H. s. var.speciosa</i>
		12	12	III	11°33,829'	46°33,790'	687	<i>H. s. var.speciosa</i>
7	São Desidério - BA	13	13	III	12°33,002'	45°55,217'	811	<i>H. s. var.speciosa</i>
8	Alvorada do Norte - GO	14	14a	I	14°30,746'	46°32,988'	551	<i>H. s. var.gardneri</i>
			14b	II	14°30,746'	46°32,988'	551	<i>H. s. var.gardneri</i>
		66	66	V	14°30,755'	46°33,055'	529	<i>H. s. var.gardneri</i>
9	Alexânia - GO	15	15a	I	16°12,756'	48°24,500'	970	<i>H. s. var.pubescens</i>

		15b	II	16°12,756'	48°24,500'	970	<i>H. s. var.pubescens</i>
		16a	I	16°12,756'	48°24,483'	962	<i>H. s. var.pubescens</i>
		16b	II	16°12,756'	48°24,483'	962	<i>H. s. var.pubescens</i>
		17	I	15°32,393'	50°26,696'	420	<i>H. s. var.gardneri</i>
		67	V	15°12,472'	50°55,184'	376	<i>H. s. var.gardneri</i>
10	Matrinchã - GO	68	V	15°12,473'	50°55,150'	384	<i>H. s. var.gardneri</i>
		71	V	15°32,399'	50°28,501'	416	<i>H. s. var.gardneri</i>
		72	V	15°32,399'	50°28,491'	399	<i>H. s. var.gardneri</i>
		18a	I	15°59,545'	50°06,402'	597	<i>H. s. var.gardneri</i>
11	Goiás - GO	18b	II	15°59,545'	50°06,402'	597	<i>H. s. var.gardneri</i>
		73	V	15°59,146'	50°06,202'	583	<i>H. s. var.gardneri</i>
		19a	I	16°34,349	48°21,734	951	<i>H. s. var.gardneri</i>
12	Silvânia - GO	19b	II	16°34,349	48°21,734	951	<i>H. s. var.gardneri</i>
		20a	I	16°34,353'	48°21,724'	951	<i>H. s. var.gardneri</i>
		20b	II	16°34,353'	48°21,724'	951	<i>H. s. var.gardneri</i>
		21	I	16°43,081'	48°05,093'	941	<i>H. s. var.gardneri</i>
13	Luziânia - GO	22a	I	16°43,104'	48°05,073'	942	<i>H. s. var.gardneri</i>
		22b	II	16°43,104'	48°05,073'	942	<i>H. s. var.gardneri</i>
		23a	I	16°35,994'	49°16,77'	729	<i>H. s. var.pubescens</i>
		23b	IV	16°35,994'	49°16,77'	729	<i>H. s. var.pubescens</i>
		24a	I	16°35,994'	49°16,77'	729	<i>H. s. var.pubescens</i>
14	Goiânia - GO	24b	II	16°35,994'	49°16,77'	729	<i>H. s. var.pubescens</i>
		25a	I	16°35,994'	49°16,77'	729	<i>H. s. var.pubescens</i>
		25b	II	16°35,994'	49°16,77'	729	<i>H. s. var.pubescens</i>
		26a	I	16°35,994'	49°16,77'	729	<i>H. s. var.gardneri</i>
		26b	II	16°35,994'	49°16,77'	729	<i>H. s. var.gardneri</i>
		74	V	16°43,891'	48°06,198'	883	<i>H. s. var.gardneri</i>
		75	V	16°48,235'	48°12,138'	952	<i>H. s. var.gardneri</i>
		27*	I	15° 48 332'	48° 52,674'	1303	<i>H. s. var.gardneri</i>
		27b	II	15° 48 332'	48° 52,674'	1303	<i>H. s. var.gardneri</i>
		28a	I	15° 48 332'	48° 52,674'	1303	<i>H. s. var.gardneri</i>
15	Pirenópolis - GO	28b	II	15° 48 332'	48° 52,674'	1303	<i>H. s. var.gardneri</i>
		29a	I	15° 48 332'	48° 52,674'	1303	<i>H. s. var.gardneri</i>
		29b	II	15° 48 332'	48° 52,674'	1303	<i>H. s. var.gardneri</i>
		78*	V	15° 48 332'	48° 52,674'	1303	<i>H. s. var.gardneri</i>
		79*	V	15° 48 332'	48° 52,674'	1303	<i>H. s. var.gardneri</i>
16	Piranhas - GO	30	I	16°27,585'	51°42,432'	500	<i>H. s. var.gardneri</i>
		80	V	16°27,618'	51°42,494'	498	<i>H. s. var.gardneri</i>
		31a	I	15°51,259'	52°11,948'	509	<i>H. s. var.gardneri</i>
		31a	II	15°51,259'	52°11,948'	509	<i>H. s. var.gardneri</i>
17	Barra do Garças - MT	32a	I	15°51,265'	52°11,918'	393	<i>H. s. var.gardneri</i>
		32b	II	15°51,265'	52°11,918'	393	<i>H. s. var.gardneri</i>
		33a	I	15°51,351'	52°11,850'	343	<i>H. s. var.gardneri</i>
		33b	II	15°51,351'	52°11,850'	343	<i>H. s. var.gardneri</i>
		34a	I	15°36,230'	53°04,538	461	<i>H. s. var.gardneri</i>
18	General Carneiro - MT	34b	II	15°36,230'	53°04,538	461	<i>H. s. var.gardneri</i>
		35a	I	15°35,820'	53°09,676'	466	<i>H. s. var.gardnerii</i>
		35b	II	15°35,820'	53°09,676'	466	<i>H. s. var.gardnerii</i>
		81	V	15°35,853'	53°09,640'	484	<i>H. s. var.gardneri</i>
		36a	I	15°30,579'	55°17,448'	729	<i>H. s. var.cuyabensis</i>
19	Chapada dos Guimarães - MT	36b	II	15°30,579'	55°17,448'	729	<i>H. s. var.cuyabensis</i>
		37a	I	15°30,741'	55°18,629'	745	<i>H. s. var.cuyabensis</i>
		37b	III	15°30,741'	55°18,629'	745	<i>H. s. var.cuyabensis</i>
		38a	I	15°29,897'	55°19,692'	740	<i>H. s. var.cuyabensis</i>
		38b	II	15°29,897'	55°19,692'	740	<i>H. s. var.cuyabensis</i>
		40a	I	16°44,743'	54°38,935'	537	<i>H. s. var.cuyabensis</i>
20	Rondonópolis- MT	40b	II	16°44,743'	54°38,935'	537	<i>H. s. var.cuyabensis</i>
		41	I	16°44,743'	54°38,935'	537	<i>H. s. var.cuyabensis</i>
		42a	I	16°50,220'	54°42,006'	453	<i>H. s. var.cuyabensis</i>
		42b	II	16°50,220'	54°42,006'	453	<i>H. s. var.cuyabensis</i>
		43a	I	17°49,688'	54°43,358'	459	<i>H. s. var.gardneri</i>
		43b	III	17°49,688'	54°43,358'	459	<i>H. s. var.gardneri</i>
21	Sonora - MS	44a	I	17°49,688'	54°43,358'	459	<i>H. s. var.gardneri</i>
		44b	II	17°49,688'	54°43,358'	459	<i>H. s. var.gardneri</i>
		45a	I	17°49,688'	54°43,358'	459	<i>H. s. var.gardneri</i>
		45b	II	17°49,688'	54°43,358'	459	<i>H. s. var.gardneri</i>
		46a	I	18°36,954'	54°46,358'	261	<i>H. s. var.gardneri</i>
22	Coxim - MS	46b	II	18°36,954'	54°46,358'	261	<i>H. s. var.gardneri</i>
		47a	I	18°36,954'	54°46,358'	261	<i>H. s. var.gardneri</i>
		47b	II	18°36,954'	54°46,358'	261	<i>H. s. var.gardneri</i>

23	Costa Rica - MS	48	48a	I	18°35,161'	54°46,144'	256	<i>H. s. var.gardneri</i>
			48b	II	18°35,161'	54°46,144'	256	<i>H. s. var.gardneri</i>
		52	52a	I	18°23,604'	53°20,270'	735	<i>H. s. var.gardneri</i>
			52b	II	18°23,604'	53°20,270'	735	<i>H. s. var.gardneri</i>
24	Alcinópolis - MS	49	49a	I	18°14,744'	53°59,150'	348	<i>H. s. var.gardneri</i>
			49b	II	18°14,744'	53°59,150'	348	<i>H. s. var.gardneri</i>
		50	50a	I	18°14,744'	53°59,150'	348	<i>H. s. var.gardneri</i>
			50b	II	18°14,744'	53°59,150'	348	<i>H. s. var.gardneri</i>
		51	51a	I	18°14,756'	53°58,896'	317	<i>H. s. var.gardneri</i>
	51b	II	18°14,756'	53°58,896'	317	<i>H. s. var.gardneri</i>		
25	Chapadão do Sul - MS	53	53	I	18°36,58'	53°00,259'	787	<i>H. s. var.gardneri</i>
		54	54a	I	18°36,58'	53°00,259'	787	<i>H. s. var.gardneri</i>
			54b	II	18°36,58'	53°00,259'	787	<i>H. s. var.gardneri</i>
26	Caçu - GO	55	55a	I	18°33,316'	51°08,102'	467	<i>H. s. var.gardneri</i>
			55b	VI	18°33,316'	51°08,102'	467	<i>H. s. var.gardneri</i>
		56	56a	I	18°33,316'	51°08,102'	467	<i>H. s. var.gardneri</i>
			56b	II	18°33,316'	51°08,102'	467	<i>H. s. var.gardneri</i>
		57	57a	I	18°33,316'	51°08,102'	467	<i>H. s. var.gardneri</i>
	57b	II	18°33,316'	51°08,102'	467	<i>H. s. var.gardneri</i>		
27	Niquelândia - GO	58*	58a	I	14° 22,510'	48° 45,010'	600	-
			58b	II	14° 22,510'	48° 45,010'	600	-
		91*	91	VI	14° 22,510'	48° 45,010'	600	-
		92*	92	VI	14° 22,510'	48° 45,010'	600	-
		93*	93	VI	14° 22,510'	48° 45,010'	600	-
		94*	94a	I	14° 22,510'	48° 45,010'	600	-
			94b	VI	14° 22,510'	48° 45,010'	600	-
		95*	95	VI	14° 22,510'	48° 45,010'	600	-
		96*	96	VI	14° 22,510'	48° 45,010'	600	-
		97*	97a	VI	14° 22,510'	48° 45,010'	600	-
			97b	I	14° 22,510'	48° 45,010'	600	-
98*	98	VI	14° 22,510'	48° 45,010'	600	-		
99*	99	VI	14° 22,510'	48° 45,010'	600	-		
100*	100	VI	14° 22,510'	48° 45,010'	600	-		
28	Posse - GO	65	65	V	14°06,833'	46°18,821'	811	<i>H. s. var.speciosa</i>
29	Ponte Alta - TO	63	63	V	10°38,987'	47°26,533'	380	<i>H. s. var.speciosa</i>
30	Orizona - GO	76	76	I	16°45,840'	48°12,665'	842	<i>H. s. var.gardneri</i>
31	Japonvar - MG	59*	59a	I	15° 56,400'	44° 13,720'	900	-
			59b	II	15° 56,400'	44° 13,720'	900	-
		82*	82	V	15° 56,400'	44° 13,720'	900	-
		83*	83	I	15° 56,400'	44° 13,720'	900	-
		84*	84	I	15° 56,400'	44° 13,720'	900	-
		85*	85	I	15° 56,400'	44° 13,720'	900	-
		86*	86	V	15° 56,400'	44° 13,720'	900	-
		87*	87	V	15° 56,400'	44° 13,720'	900	-
		88*	88	V	15° 56,400'	44° 13,720'	900	-
		89*	89	V	15° 56,400'	44° 13,720'	900	-
		117*	117	VI	15° 56,400'	44° 13,720'	900	-
		118*	118	VI	15° 56,400'	44° 13,720'	900	-
		119*	119	VI	15° 56,400'	44° 13,720'	900	-
		120*	120	VI	15° 56,400'	44° 13,720'	900	-
122*	122	VI	15° 56,400'	44° 13,720'	900	-		
123*	123	VI	15° 56,400'	44° 13,720'	900	-		
125*	125	VI	15° 56,400'	44° 13,720'	900	-		
126*	126	VI	15° 56,400'	44° 13,720'	900	-		
32	Araguapaz	69*	69	V	15° 20,185'	50° 38,030'	354	<i>H. s. var.gardneri</i>
		70*	70	V	15° 20,185'	50° 38,030'	354	<i>H. s. var.gardneri</i>

*Coordenada por área e não por planta.

Tabela 4.2. Localidades, coordenadas geográficas e variedades das matrizes de mangabeira do Cerrado representadas na coleção da EA/UFG (Anexos B), em função da variedade botânica.

VARIEDADE BOTÂNICA	MUNICÍPIO - ESTADO	N° DE INDIVÍDUOS	
		POR MUNICÍPIO	POR VARIEDADE BOTÂNICA
H. s. var.gardneri	Porangatu - GO	3	66
	Alvorada do Norte - GO	3	

	Matrinchã – GO	5	
	Goiás - GO	3	
	Silvânia - GO	4	
	Luziânia - GO	3	
	Pirenópolis – GO	8	
	Piranhas - GO	2	
	General Carneiro – MT	5	
	Sonora – MS	6	
	Coxim – MS	6	
	Costa Rica - MS	2	
	Alcinópolis – MS	6	
	Chapadão do Sul - MS	3	
	Caçu – GO	6	
	Orizona – GO	1	
	Chapada dos Guimarães – MT	6	
H. s. var.cuyabensis	Rondonópolis- MT	5	11
	Campinorte - GO	3	
H. s. var.pubescens	Alexânia - GO	4	7
	Jalapão – TO	6	
	Ponte Alta - TO	1	
	Mateiro - TO	1	
	Dianópolis - TO	2	
H. s. var.speciosa	São Desidério - BA	1	11
*Sem identificação		18	
	Japonvar – MG		18

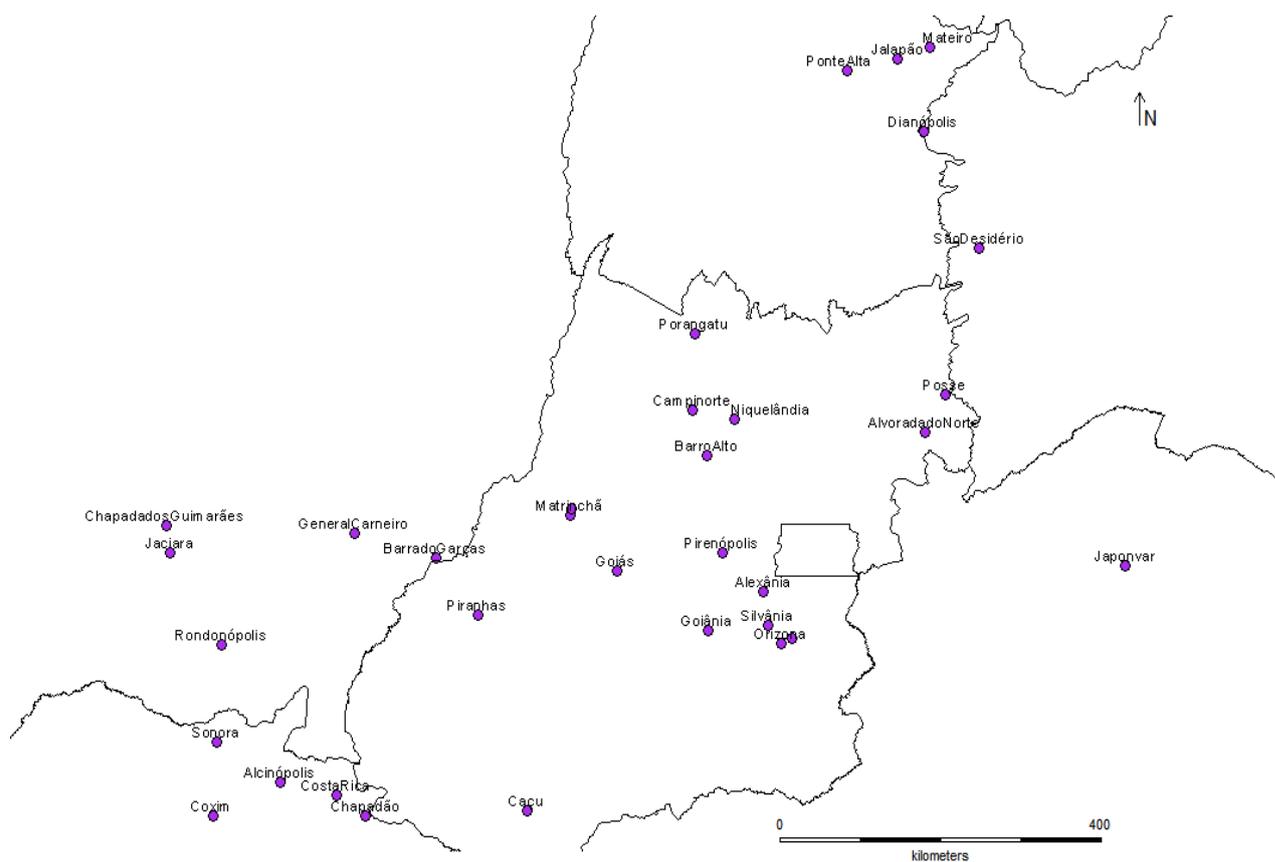


Figura 4.1. Localidades de coleta das subpopulações de mangabeira do Cerrado representadas na coleção da EA/UFG.

4.2.2 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de acordo com protocolo CTAB 2%, descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998). Foram realizadas adaptações na tentativa de eliminar o excesso de polissacarídeos que se associam as moléculas de DNA. Para tanto foi acrescido no tampão de extração 1,5% de β -mercaptoetanol e 5% de PVPP. Após a incubação a 65°C por 45 minutos, foi realizada lavagem com CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1), seguida de precipitação do DNA com álcool isopropílico. Após a precipitação, o DNA foi submetido à lavagem com NaCl a 1 M. O DNA foi novamente precipitado e submetido a lavagem com etanol 70% (2X), seguido da lavagem com etanol absoluto 1X (Figura 4.2). A quantificação do DNA extraído foi realizada a partir de eletroforese em gel de agarose a 1%. O gel foi corado com brometo de etídio à concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ por 15 minutos. As fotos foram obtidas a partir de uma câmera escura e transiluminador UV. A quantificação dos fragmentos de DNA reveladas no gel de agarose foi realizada a partir da comparação visual com o DNA Fago λ .

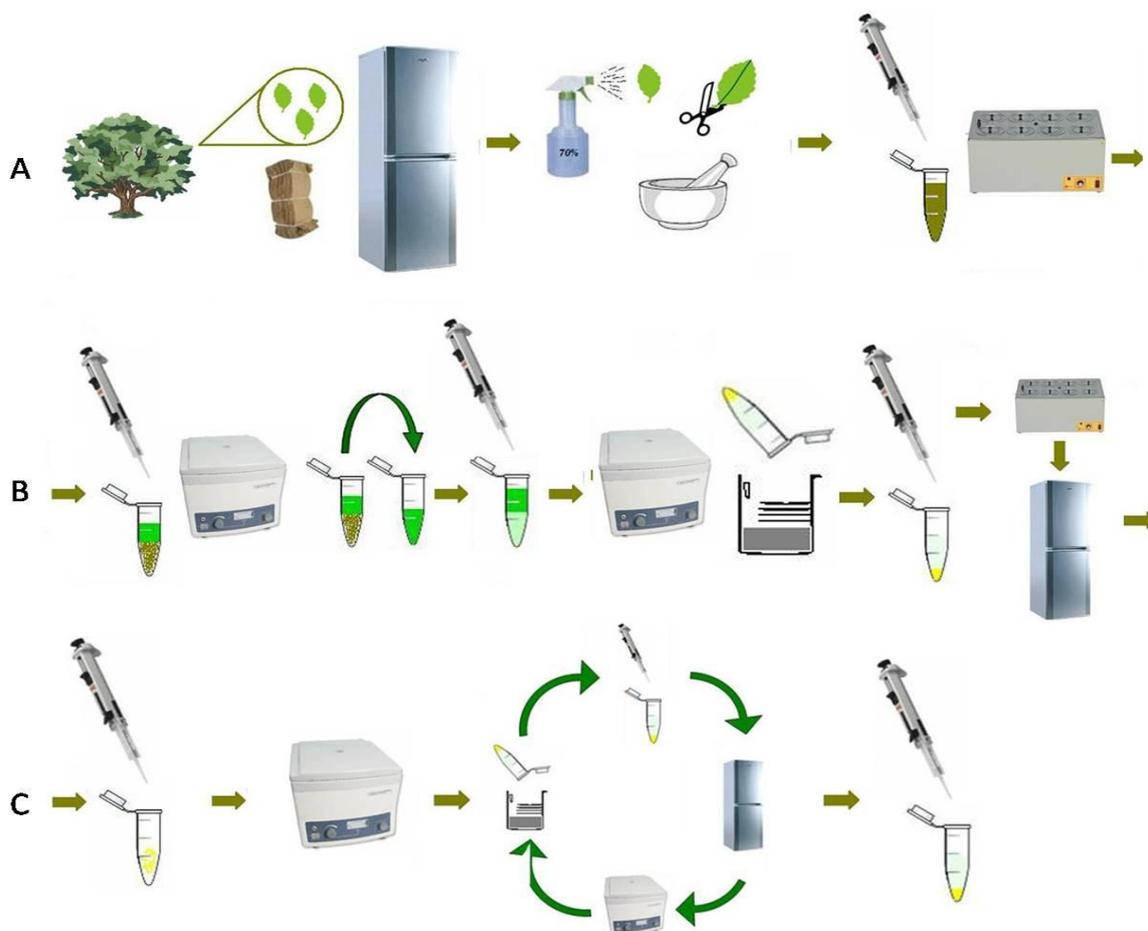


Figura 4.2: Etapas do processo de extração de DNA, A) Coleta e armazenamento de folhas, Limpeza e liofilização das folhas na presença de nitrogênio líquido em cadinho de porcelana, Acréscimo de tampão de extração ao macerado e

submissão das amostras ao banho-maria; B) Desproteção com CIA, seguido de lavagem com sal; C) Lavagem com etanol 70% (2X), seguido da lavagem com etanol absoluto (1X), Fonte: Almeida Júnior (2008).

4.2.3 Condições de amplificação

Foram utilizados seis pares de iniciadores microssatélites genômicos (HS01, HS05, HS24, HS26, HS27 e HS30) desenvolvidos e padronizados para a espécie *H. speciosa* (Tabela 4.3), conforme descrito no Capítulo 1. A amplificação foi realizada em um volume final de 25 µL por reação composta por 10 ng de DNA genômico, 1X de tampão de PCR; 1,5 mM MgCl₂; 0,4 mM dNTPs; 0,1 µM de cada iniciador e 1 U de *Taq* DNA polimerase. As amplificações ocorreram no termociclador modelo PTC-100 (*MJ Research Inc.*) em microplacas de 96 slots, ajustado para 30 ciclos com a seguinte programação: desnaturação: 94 °C -1 minuto; anelamento: variação de temperatura conforme o iniciador testado; alongação: 72 °C - 1 minuto. Foi acrescentado ao programa uma etapa inicial de 94 °C -5 minutos e uma etapa final de 72 °C - 7 minutos.

Tabela 4.3: Sequências dos pares de iniciadores desenvolvidos para *H. speciosa* que amplificaram locos microssatélites.

Iniciador	Sequencia dos iniciadores (<i>forward e reverse - 5' → 3'</i>)	Temperatura de Anelamento °C	Microsatellite
HS 01	F: GTGTCTTCCATCCGAGCTTAAC	50	(GCA) ₆ (TC) ₂₀ (GCA) ₈
	R: TTCCCAGAAAGGAGAGGTACA		
HS 05	F: GGGTGTACTGCCACAAGGTACT	58	(GA) ₁₅ (TGC) ₆
	R: GTGTCTTCCATCCGAGCTTAAC		
HS 24	F: GCTAAATCAAGCAAACCTCGAC	58	(AG) ₁₂
	R: AAAGCAGTCCATGATCCATTTC		
HS 26	F: CAAACAAGCTTTATGTGGGTCA	58	(CT) ₁₀
	R: AGCTCAAGGAAGTGGGATCTAA		
HS 27	F: TATAGTGGTCTCTGCACCCTTGT	54	(GA) ₁₄
	R: TTTCCCTTGTGCTTCGC		
HS 30	F: GAGGAATCTCAGCCAAGTCCTA	56	(AG) ₁₀
	R: CCCAGCCTCTACAAACTCTCTG		

Para verificar a amplificação dos iniciadores utilizou-se a eletroforese em géis de poliacrilamida 6%, corados com prata segundo Creste et al., 2001 (Figura 4.3). As frequências alélicas e genotípicas em cada loco foram obtidas a partir da leitura dos dados nos géis, feita com uso de transluminador. Os fragmentos visualizados foram estimados em pares de base, por comparação com DNA padrão de peso molecular conhecido (*ladder* 10 bp - Invitrogen®), cuja amplitude é de 10 bp a 330 bp. Os fragmentos que apresentaram mesma mobilidade foram considerados como o mesmo alelo, a presença de fragmento

único foi considerada como alelos em homozigose. Os alelos nulos não foram considerados para as análises.

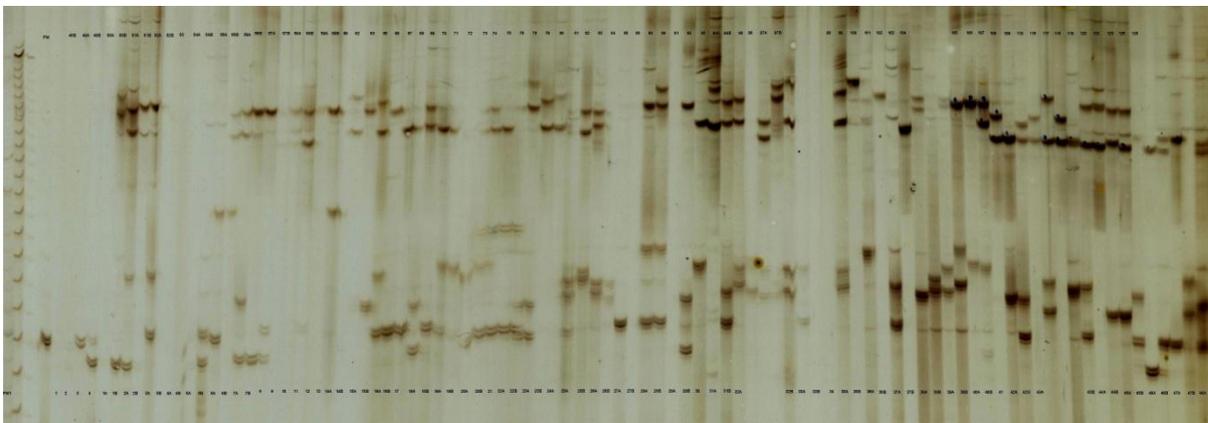


Figura 4.3: Perfil dos fragmentos gerados a partir das reações de PCR, com o iniciador HS01, com 155 genótipos, aplicado em sistema multiplex. Poliacrilamida 6%, corado com prata.

4.2.4 Metodologia de análise estatística dos dados

Os dados coletados a partir das frequências alélicas e genotípicas em cada loco foram organizados em planilhas e convertidos para os formatos exigidos para as análises computacionais. Os indivíduos foram avaliados quanto à subpopulação, bem como a variedade botânica pertencente sob os seguintes aspectos:

- a) Parâmetros genéticos: os parâmetros genéticos de diversidade foram obtidos pelo programa GDA. Foram estimados: a porcentagem de locos polimórficos (P); o número médio de alelos por loco (A); o número médio de alelos por loco polimórfico (Ap); a heterozigosidade esperada sob condições do equilíbrio de Hardy-Weinberg (He), heterozigosidade observada (Ho) e índice de fixação intrapopulacional (f). Foram estabelecidos intervalos de confiança a 95% de probabilidade a partir do procedimento de “*bootstrap*” com 10.000 repetições (Weir, 1996).
- b) Estrutura populacional: a decomposição da variação total e suas componentes entre e dentro de populações foi realizada pela metodologia desenvolvida por Excoffier et al. (1992). As estatísticas F foram estimadas sob modelo aleatório de acordo com Weir (1996), em que as populações amostradas são consideradas como representativas da espécie e com uma história evolutiva comum (modelo mutacional de alelos infinitos). As

estatísticas F incluem o coeficiente de correlação intra-classe dos alelos (identidade por estado) para genes dentro de indivíduos, com relação à população total (F_{IT}); o coeficiente de correlação de genes dentro de indivíduos, considerando uma subpopulação (F_{IS}); e o coeficiente de correlação de genes dentro de subpopulações com relação à população total (F_{ST}) (Weir & Cockerham 1984) e foi calculado com o uso do programa SPAGeDI v 1.2 (Hardy & Vekemans, 2007). Foram estabelecidos intervalos de confiança a 95% de probabilidade para os respectivos parâmetros a partir do procedimento de “*bootstrap*” com 10.000 repetições (Weir, 1996). O F_{ST} é uma medida de diferença entre as populações e tende a aumentar à medida que a população diverge por deriva genética e a diminuir devido ao fluxo gênico. O F_{IS} se refere à probabilidade de dois alelos serem idênticos por descendência. Quando a idéia de identidade por descendência é estendida a alelos que não estão necessariamente no mesmo indivíduo, o coeficiente de endogamia assume outro sentido. Assim, o F_{IT} é a endogamia referente a todas as populações enquanto que o F_{IS} é a endogamia dentro de cada população. Em locos microssatélites, o processo mutacional pode não estar de acordo com o que se admite no modelo de alelos infinitos com baixas taxas de mutação. Por essa razão, a estrutura genética molecular também foi quantificada pela estatística N_{ST} , análogo ao F_{ST} , que leva em consideração o tamanho dos alelos de cada loco (“alelos ordenados”) na estimativa da estrutura genética populacional (Pons & Petit 1996). A análise da variância do tamanho dos alelos nesse caso foi realizada a partir do programa SPAGeDI v 1.2 (Hardy & Vekemans, 2007).

c) Estruturação da variabilidade: a matriz de valores estimados para as distâncias genéticas de Nei (1972) foi utilizada para a construção de dendrogramas pelo método UPGMA (*unweighted pair-group method by arithmetic averages*), que produz um arranjo hierárquico de classificação das subpopulações. A representatividade deste dendrograma foi testada por meio da correlação entre as distâncias genéticas originais e as distâncias entre as subpopulações no dendrograma (correlação cofenética). A estabilidade dos agrupamentos também foi testada, com o uso do procedimento de reamostragem por 10000 bootstraps. As matrizes de distâncias também foram representadas graficamente pelo método de ordenação denominado Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS) por meio do programa NTSYS versão 2.02 (Rohlf, 1989).

d) Padrão espacial interpopulacional: a fim de se avaliar a existência de padrões espaciais associados a divergência genética observada entre as populações, foi feita a estimativa do coeficiente de correlação de Pearson entre as matrizes de distâncias genéticas

de Nei (1972) e de distâncias geográficas entre as subpopulações, obtidas a partir das coordenadas geográficas. A significância dessa correlação foi testada pelo procedimento de Mantel, utilizando-se 10.000 permutações. A análise da estruturação genética espacial foi realizada a partir do programa SPAGeDI v 1.2 (Hardy & Vekemans, 2007).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Variabilidade Genética

Os locos avaliados apresentaram alto polimorfismo, com índice médio de 20,17 alelos por loco (Tabela 4.4). O loco HS27 apresentou o maior número de alelos (37 alelos) enquanto que o loco HS26 apresentou o menor número (sete alelos). O número médio de alelos por cada uma das 32 áreas geográficas foi de 3,06 alelos. Este valor relativamente baixo ocorreu em função do pequeno número de indivíduos oriundos de cada área geográfica devido à estratégia de coleta adotada que foi a de selecionar plantas produtivas do máximo de populações. Já ao considerar as diferentes variedades botânicas, o número médio de alelos foi de 8,79.

Tabela 4.4: Parâmetros de diversidade genética estimados com base nos locos de toda a população, variedades botânicas e áreas geográficas de populações naturais de *H. speciosa*. n: número de indivíduos. A: número médio de alelos por loco; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg; f: índice de fixação intrapopulacional.

Parâmetros genéticos por loco, considerando toda a população						
LOCO	N	A	He	Ho	f	
HS01	120	23	0,939609	0,583333	0,380162	
HS05	110	18	0,886716	0,663636	0,252443	
HS24	86	14	0,857201	0,476744	0,445285	
HS26	125	7	0,585285	0,416000	0,290063	
HS27	90	37	0,963935	0,866667	0,101417	
HS30	112	21	0,860426	0,241071	0,720729	
Média	107, 107	20,17	0,848862	0,541242	0,363557	
Parâmetros genéticos por variedade botânica ^{1/}						
Variedade botânica	N	A	He	Ho	f	
<i>H. s. var. speciosa</i>	7,66	7,00	0,80	0,55	0,32	
<i>H. s. var. gardneri</i>	48,33	15,33	0,84	0,57	0,32	
<i>H. s. var. cuyabensis</i>	6,33	4,50	0,62	0,42	0,34	
<i>H. s. var. pubenses</i>	10,50	8,33	0,81	0,54	0,33	
Média	18,20	8,79	0,77	0,52	0,33	
Parâmetros genéticos por área geográfica						

	N	A	He	Ho	f
Média	3,45	3,06	0,63	0,57	0,18

^{1/} Nesta análise foram excluídas as populações Niquelândia, Japonvar, Barra do Garça, Posse e Araguapaz para as quais havia dúvidas sobre as variedades botânicas

A H_e foi maior que a H_o tanto no estudo por loco, ao considerar todos os indivíduos como pertencentes a uma única população, quanto para áreas geográficas e variedades botânicas com valores médios respectivos de 0,84; 0,63; 0,77 para H_e e 0,54; 0,57 e 0,52 para H_o . Os valores obtidos para H_e são indicativos de diversidade genética elevada. Já aqueles obtidos para H_o sugerem uma taxa relativamente alta de endogamia nas subpopulações estudadas. As estimativas dos índices médios de fixação (f) foram respectivamente de 0,36, 0,33 e 0,18 para toda a população, por variedades botânicas e por áreas geográficas (Tabela 4.4). Este índice de fixação não pode ser tomado como indicativo de endogamia por sistema reprodutivo nos dois primeiros casos, já que as análises consideraram como população uma mistura de subpopulações. O valor obtido na análise por subpopulação revela certo grau de endogamia nas subpopulações. Como para a maioria das progênies foram analisadas duas plantas irmãs, este índice contém um confundimento dos efeitos de progênies e endogamia de plantas individuais. O fato de a espécie ter apresentado autoincompatibilidade em um estudo realizado com uma população do Nordeste do Brasil (Darrault & Schindwein, 2006) sugere o sistema de alogamia. O confundimento referido e o pequeno número de matrizes por subpopulação neste estudo não permitem inferências conclusivas sobre sistema reprodutivo. Desta forma, recomendam-se estudos de biologia reprodutiva e fluxo gênico intrapopulacional para esclarecer o sistema reprodutivo das populações de mangabeira do Cerrado.

4.3.2 Estrutura genética interpopulacional

O valor obtido para F_{IS} nesse trabalho foi de 0,2158, porém, como citado no item 4.3.1, são necessários estudos para o esclarecimento do sistema reprodutivo das populações de mangabeira do Cerrado. O valor estimado de F_{ST} , ao considerar cada área geográfica como uma subpopulação, foi de 0,19 (Tabela 4.5). Este parâmetro é um indicativo da divergência genética entre as subpopulações, o que sugere um alto nível de diferenciação. A magnitude da diferença genética entre subpopulações de uma espécie é geralmente relacionada à intensidade de fluxo gênico interpopulacional. Em geral, a maior porcentagem da diversidade genética encontra-se dentro de subpopulações. A distribuição

dessa variabilidade reflete, ao menos em parte, a ação de processos genéticos do ponto de vista populacional (seleção e deriva genética), que aliados ao fluxo gênico restrito, direcionam a distribuição não aleatória de genótipos em populações naturais. No caso de marcadores eletivamente neutros, como os microssatélites, a diferenciação entre populações é resultado apenas da deriva genética. A diversidade genética entre populações é uma característica de populações fragmentadas e levadas ao isolamento. Assim, subpopulações com menor tamanho efetivo e endogamia elevada resultam em maior probabilidade de diferenciação genética. O fluxo gênico por sua vez, homogeneiza as diferenças genéticas entre as populações, mesmo em presença de seleção intensa (Valva & Coelho, 1997; Coelho & Valva, 2001). Em uma população panmítica é esperado que toda a variação genética encontre-se dentro de subpopulações, pois do ponto de vista genético, todos os indivíduos da população teriam as mesmas chances de intercruzarem. Assim, uma variação genética alta entre subpopulações significa que há fatores evolutivos atuando no sentido de diferenciá-las, o que induz ao pensamento de restrição ao fluxo gênico. Neste estudo, o alto valor de F_{ST} leva à hipótese de restrição ao fluxo gênico entre subpopulações. Do ponto de vista da conservação genética, isto indica a necessidade de amostragem de um grande número de subpopulações para representarem a variabilidade genética interpopulacional, seja para conservação *in situ*, seja para coleta de germoplasma para conservação *ex situ*.

O uso das estatísticas F de Wright pressupõe o modelo mutacional de alelos infinitos. Para dados de microssatélites uma alternativa seria considerar o modelo mutacional *stepwise*. Por este modelo a divergência entre alelos seria proporcional à diferença no número de repetições dos motivos (Slatkins, 1995). A estimativa do parâmetro N_{ST} , análogo ao F_{ST} , porém considerando o tamanho dos alelos, forneceu um valor de 0,3251, valor consideravelmente maior que o F_{ST} . Esta diferença marcante ocorre quando a variação no tamanho dos alelos dentro das subpopulações é menor que as diferenças entre subpopulações. Este valor, portanto, reforça a grande diversidade existente entre as subpopulações de mangabeira do Cerrado.

Tabela 4.5 Estimativa dos parâmetros indicadores do grau de estruturação genética em naturais de mangabeira (*H. speciosa*) com dados de seis locos microssatélites, 32 áreas geográficas.

Loco	F_{IT}	F_{IS}	F_{ST}	N_{ST}
HS01	0,38	0,26	0,16	0,32
HS05	0,25	0,10	0,16	0,18

HS24	0,45	0,18	0,33	0,59
HS26	0,29	0,20	0,11	0,21
HS27	0,10	0,01	0,09	0,29
HS30	0,72	0,61	0,29	0,64
Total	0,36	0,21	0,19	0,32

Na mangabeira, apesar do número limitado, alguns trabalhos foram desenvolvidos com o intuito de investigar a variabilidade existente na espécie. A maioria dos trabalhos realizados avalia dados morfológicos como Silva Júnior et al (2003) que, ao avaliarem uma população adulta de mangabeira nativa em Sergipe, constataram a existência de variabilidade entre as plantas. Almeida et al. (2003) encontraram grande variabilidade genética ao estudar plantas de um pomar em Rio Largo, Alagoas. Barreira Neto (2003) avaliou acessos de um banco de germoplasma na Paraíba e constatou que há uma variabilidade acentuada em relação a produtividade, tanto entre procedências quanto entre acessos de dentro de procedências. Rezende et al., (2003) realizaram estudo a partir de dados da altura da planta, diâmetro do caule e número de frutos em mangabeiras do Cerrado e observaram diversidade entre populações e entre regiões. Ganga (2008); Ganga et al., (2010) realizou uma avaliação de frutos das matrizes que originaram algumas das progênes estudadas nesse trabalho. A grande parte da variabilidade, segundo a autora, foi evidenciada dentro das variedades para todos os caracteres avaliados: comprimento do fruto; diâmetro do fruto; peso do fruto; número de sementes; peso total de sementes; peso médio de uma semente; peso da polpa mais casca e rendimento de polpa mais casca. Ganga (2008); Ganga et al., (2009), realizou ainda um estudo a partir de progênes da EA/UFG para estimar parâmetros genéticos relativos ao desenvolvimento inicial das plantas no campo. Muitas das progênes avaliadas são as mesmas estudadas nesse trabalho. As progênes avaliadas apresentaram altos níveis de variação genética para os caracteres de diâmetro do caule, altura de plantas e taxas de crescimento. Para o diâmetro do caule, a maior parte da variação genética está dentro de populações e para altura está entre populações.

Já em relação a estudos a partir de dados com marcadores moleculares cita-se como exemplo Silva (2006) que realizou um estudo de polimorfismo a partir de cpDNA, em oito populações naturais do Cerrado e constatou um elevado nível de diversidade genética em que cerca de 7% a 9% da variação genética total foi encontrada entre as populações avaliadas. O valor de divergência genética encontrada dentro das populações foi de 90% a 93%. Capinan (2007) realizou estudo a partir de marcadores moleculares

RAPD, para três populações naturais no estado da Bahia e observou que 16,1% da variabilidade genética foi encontrada entre as populações e 83,9% dentro de populações. Esses valores foram semelhantes ao encontrado por Moura (2003); Moura et al., (2011) em estudos a partir de marcadores moleculares RAPD para oito populações naturais do Cerrado, em que a maior parte da variação genética (80,33%) concentrou-se dentro de subpopulações. Moura (2003) avaliou ainda o índice de ϕ_{ST} , uma estimativa usada para marcadores dominantes, análoga a estimativa de F_{ST} . O valor encontrado para o ϕ_{ST} foi de 0,1956, muito próximo ao valor obtido nesse estudo com marcadores microssatélites para F_{ST} (0,19265). Foi realizada também, pela autora uma análise entre duas variedades botânicas (*H. s. var. pubescens* e *H. s. var. gardinerii*) em que a maior variabilidade encontrada foi dentro das variedades (90,70%) A variação encontrada entre as variedades foi de 4,71%. Todos os trabalhos citados corroboram com os dados obtidos neste estudo. Isto é, apontam para uma variabilidade genética significativa entre subpopulações.

A partir das distâncias genéticas de Nei (1972) foi construído um dendrograma para melhor visualização da diversidade genética a partir do método UPGMA. A distribuição da diversidade genética detectou um agrupamento das populações de maneira aleatória, independente da distância geográfica, o que indica que não há estruturação genética das populações no espaço geográfico. Porém, os grupos não foram definidos com muita clareza. Moura (2003) também detectou uma fraca associação entre subpopulações de mangabeiras do Cerrado na representação gráfica pelo método UPGMA, e não evidenciou um padrão geográfico claro de agrupamento entre os indivíduos avaliados. Na tentativa de uma melhor interpretação da diversidade genética, optou-se pelo método NMDS para a representação gráfica tridimensional das distâncias genéticas (Figura 4.5). Foi possível observar mais uma vez a forte tendência das populações se agruparem aleatoriamente.

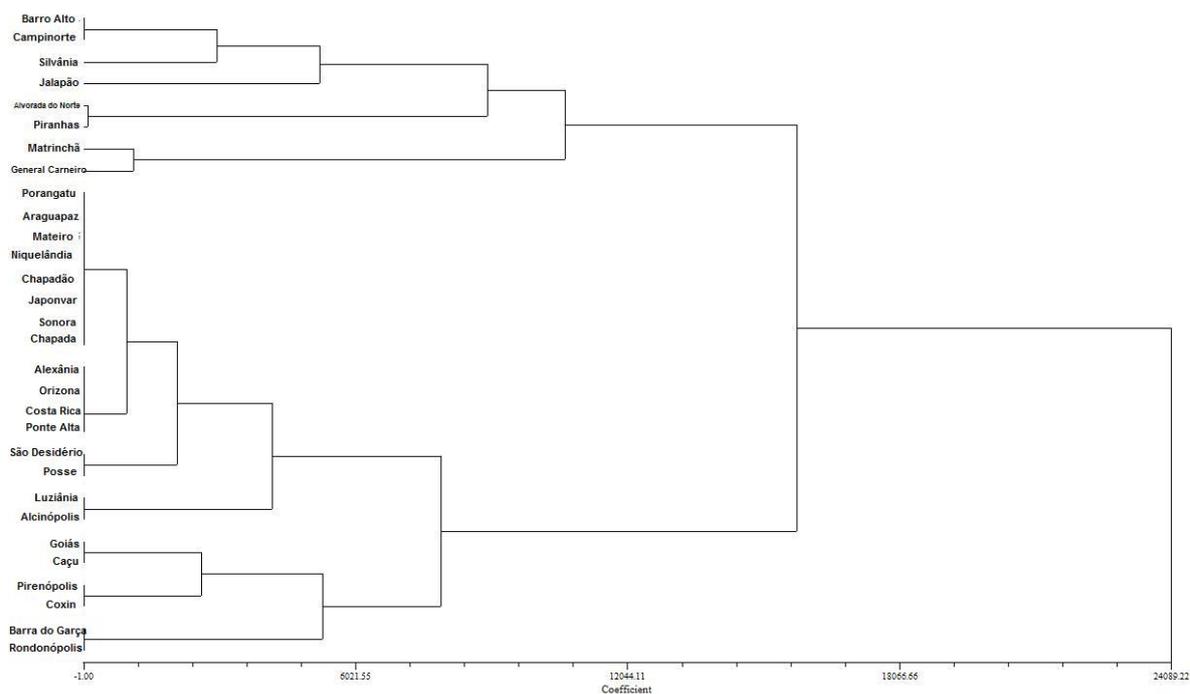


Figura 4.4: Dendrograma para melhor visualização da diversidade genética a partir do método UPGMA.

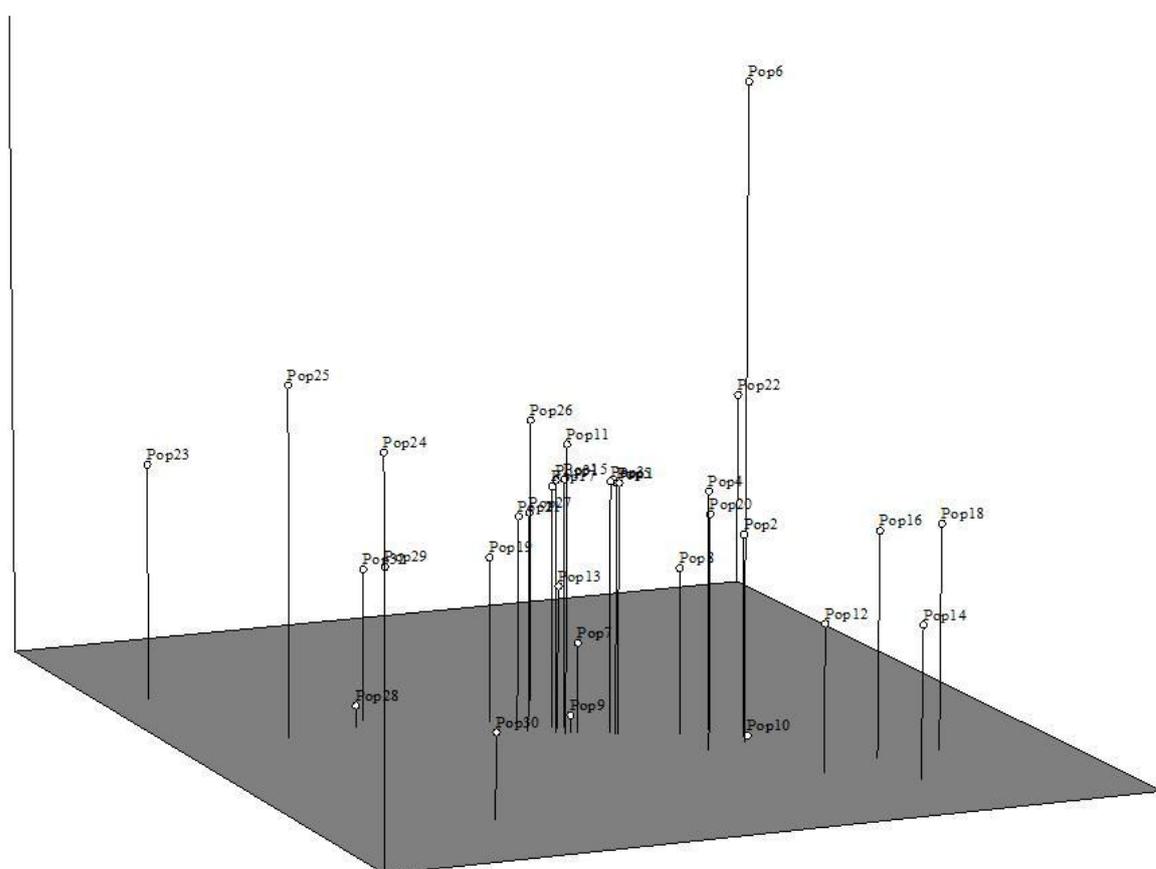


Figura 4.5: Análise de coordenadas principais (PCA) (três dimensões) realizada sobre a matriz de distâncias genéticas de Nei (1972) entre 32 populações de H.

speciosa, a partir de dados microssatélites. 1 (Barro Alto – GO), 2 (Campinorte – GO), 3 (Porangatu – GO), 4 (Jalapão – TO), 5 (Mateiro – TO), 6 (Dianópolis – TO), 7 (São Desidério – BA), 8 (Alvorada do Norte – GO), 9 (Alexânia – GO), 10 (Matrinchã – GO), 11 (Goiás – GO), 12 (Silvânia – GO), 13 (Luziânia – GO), 14 (Goiânia – GO), 15 (Pirenópolis – GO), 16 (Piranhas – GO), 17 (Barra do Garças – MT), 18 (General Carneiro – MT), 19 (Chapada dos Guimarães – MT), 20 (Rondonópolis- MT), 21 (Sonora – MS), 22 (Coxim – MS), 23 (Costa Rica – MS), 24 (Alcinópolis – MS), 25 (Chapadão do Sul – MS), 26 (Caçu – GO), 27 (Niquelândia – GO), 28 (Posse – GO), 29 (Ponte Alta – TO), 30 (Orizona – GO), 31 (Japonvar – MG), 32 (Araguapaz).

A variação entre populações pode existir também em escala geográfica maior. Geralmente, quanto mais distanciadas estão as populações, maior é a diferença detectada entre as frequências alélicas e nas características fenotípicas de base genética. A análise de correlação entre as distâncias genéticas de Nei (1972) e as distâncias geográficas observadas entre as populações revelou a ausência de uma correlação significativa entre estas duas variáveis ($r: 0,12128$, $p=0,0719$) o que confirma, para esse estudo, a distribuição aleatória dos genótipos e reforça a hipótese de restrição ao fluxo gênico, mesmo a curtas distâncias (Figura 4.6).

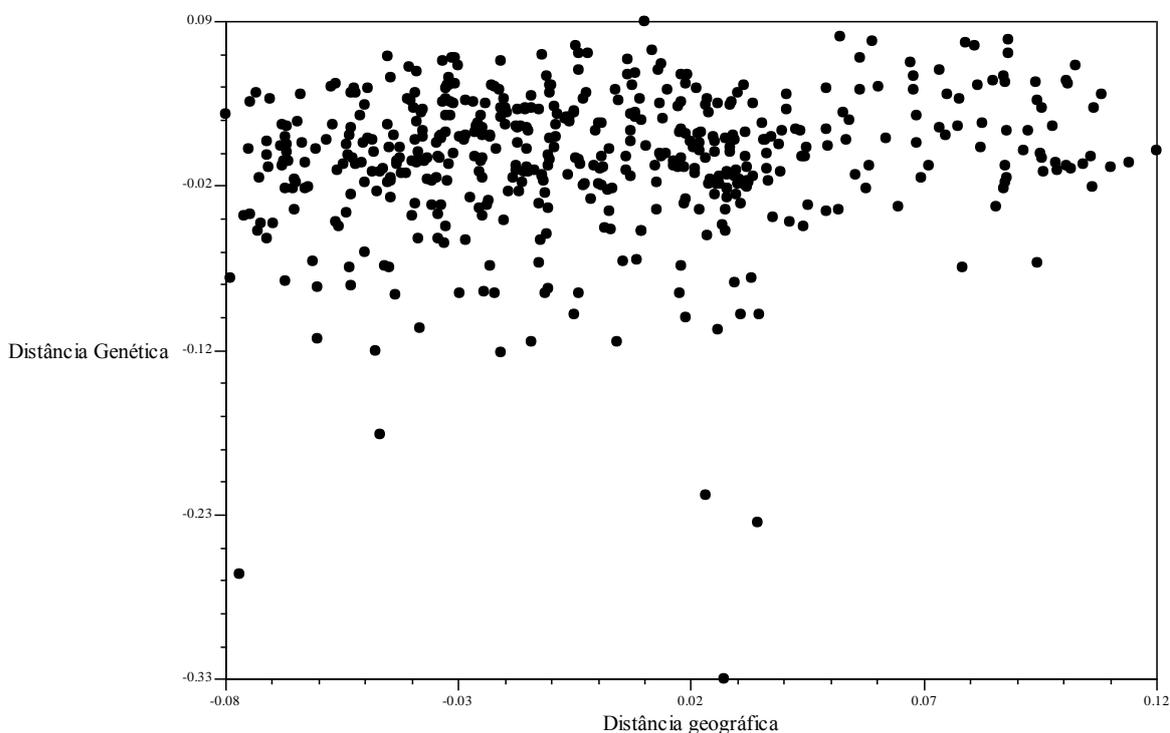


Figura 4.6 Relação existente entre as distâncias geográficas e as distâncias genéticas de Nei (1972) entre as 32 populações de *H. speciosa*, calculadas a partir de seis locos microssatélites genômicos.

Os resultados apontam, portanto, que o fator de maior relevância para a significativa variabilidade encontrada entre subpopulações, de forma não estruturada no espaço ocorre em função da deriva genética, o que causa estruturação aleatória das subpopulações, sem uma ordem geográfica lógica. Assim, o efeito da deriva genética estaria se sobrepondo ao efeito do fluxo gênico, ou seja, enquanto a deriva genética causa uma estruturação aleatória da variabilidade entre subpopulações, o fluxo gênico não contrabalançaria esta diferenciação, mesmo a distâncias relativamente pequenas. Dados similares a este foram obtidos por Moura (2003) que, na análise de subpopulações de mangabeiras do Cerrado, não detectou correlação significativa entre distâncias genéticas e distâncias geográficas.

4.3.3 Estrutura genética entre variedades botânicas

Na análise de estrutura genética ao se considerarem as variedades botânicas como diferentes populações, observou-se uma estimativa de 0,0583 para a estatística F_{ST} (Tabela 4, 5), o que indica que 5,83% da variabilidade genética total encontram-se entre variedades botânicas e o restante dentro das variedades. O valor estimado de N_{ST} foi de 0,1738 o que mais uma vez indica, a maior sensibilidade deste parâmetro para detectar divergência entre populações. Para esta análise foram desconsideradas as subpopulações para as quais havia dúvida quanto à classificação nas diferentes variedades botânicas. A população de Posse – GO, apresentava características de folha intermediárias entre as variedades *H. s. var gardneri* e *H. s. var. speciosa*, enquanto as populações de Barra do Garças – MT e General Carneiro – MT apresentavam características intermediárias entre *H. s. var gardneri* e *H. s. var. cuyabensis*. A posição geográfica destas subpopulações leva à hipótese de cruzamento entre populações de diferentes variedades botânicas nas regiões limítrofes de ocorrência (Ganga, 2008). A população de Japonvar, no norte de Minas Gerais, apresenta folhas semelhantes à *H. s. var. speciosa*. Segundo a descrição de Monachino (1945) a variedade *H. s. var. maximiliani* diferencia-se de *H. s. var. speciosa* por algumas características florais. Como consta a ocorrência da primeira em Minas Gerais e não foi realizada uma análise de diferenciação por características florais, a população de Japonvar também foi desconsiderada nesta primeira análise. Comparando-se a magnitude da diversidade genética entre variedades botânicas com a variabilidade total entre subpopulações, verificou-se que uma porção considerável desta variabilidade encontra-se entre subpopulações dentro

de variedades botânicas, com aproximadamente 14% quando medida pelo F_{ST} e 13% com o N_{ST} .

Considerando-se, como hipótese, a população de Japonvar – MG como uma quinta variedade botânica os valores de F_{ST} e N_{ST} estimados foram 0,0643 e 0,1927, respectivamente, semelhantes aos valores obtidos desconsiderando esta população (Tabela 4.6). O número médio de alelos por loco nesta população foi de 8,10. Foram encontrados ainda para a referida população, dois alelos privados no loco HS27, um no loco HS24 e um no loco HS01.

Tabela 4.6 Estimativa dos parâmetros indicadores do grau de estruturação genética em populações naturais de mangabeira (*H. speciosa*) com dados de seis locos microssatélites, a partir da diferença entre as variedades botânicas.

Estimativa para quatro variedades botânicas					Estimativa para variedades botânicas, considerando Japonvar como uma variedade a parte				
Loco	F_{IT}	F_{IS}	F_{ST}	N_{ST}	Loco	F_{IT}	F_{IS}	F_{ST}	N_{ST}
HS01	0,382	0,377	0,008	0,155	HS01	0,382	0,377	0,006	0,157
HS05	0,249	0,207	0,053	0,067	HS05	0,293	0,225	0,088	0,107
HS24	0,558	0,478	0,153	0,410	HS24	0,524	0,439	0,150	0,446
HS26	0,265	0,225	0,051	0,123	HS26	0,256	0,227	0,037	0,109
HS27	0,124	0,081	0,047	0,246	HS27	0,125	0,081	0,048	0,245
HS30	0,657	0,644	0,036	0,135	HS30	0,677	0,661	0,046	0,149
Total	0,374	0,335	0,058	0,173	Total	0,378	0,336	0,064	0,192

Foi realizada uma análise de estrutura genética par a par entre as variedades botânicas (Tabela 4.7). A partir das distâncias genéticas obtidas, foi construído um dendrograma a fim de uma melhor representação da relação entre as variedades botânicas (Figura 4.7). Observou-se uma maior semelhança entre *H. s. var. gardneri* e *H. s. var. pubescens* o que era esperado pelo fato de apresentarem uma simpatria em sua ocorrência (Rizzo & Ferreira, 1990). A variedade *H. s. var. cuyabensis* mostrou-se a mais divergente em relação às demais. O fato de a população de Japonvar – MG não ter se agrupado com *H. s. var. speciosa*, corrobora a hipótese de esta pertencer a outra variedade botânica, o que deve ser melhor investigado.

Tabela 4.7 Estimativa dos parâmetros indicadores do grau de estruturação genética em populações naturais de mangabeira (*H. speciosa*) com dados de seis locos microssatélites, a partir da diferença entre as variedades botânicas sob o modelo de modelo *stepwise*, par a par.

LOCO	P/G	P/S	G/S	G/J	J/S	G/C	P/J	P/C	C/S	C/J
HS01	-0,0176	0,0887	0,0808	0,0812	-0,0303	0,1771	0,0745	0,1353	0,4000	0,4269
HS05	0,0372	0,1267	0,1314	0,1359	0,2791	-0,0240	0,2454	0,0339	0,1187	0,1084

HS24	-0,0252	-0,0034	0,0489	0,0831	0,2476	0,7432	0,0943	0,7190	0,5249	0,9111
HS26	0,2357	0,1142	0,0569	-0,0098	0,0280	0,0166	0,2883	0,2391	0,0208	-0,0261
HS27	0,1568	0,0548	0,0885	0,1038	0,2186	0,1454	0,4024	0,4682	0,3930	0,2205
HS30	0,0748	0,0515	-0,0041	0,1589	0,1153	0,2498	0,2224	0,2200	0,2758	0,2169
TOTAL	0,0667	0,0829	0,0839	0,0996	0,1517	0,1979	0,2274	0,2759	0,3013	0,3873

P: *H. s. var. pubescens*; **G:** *H. s. var. gardneri*; **S:** *H. s. var. speciosa*; **J:** japonvar; **C:** *H. s. var. cuyabensis*;

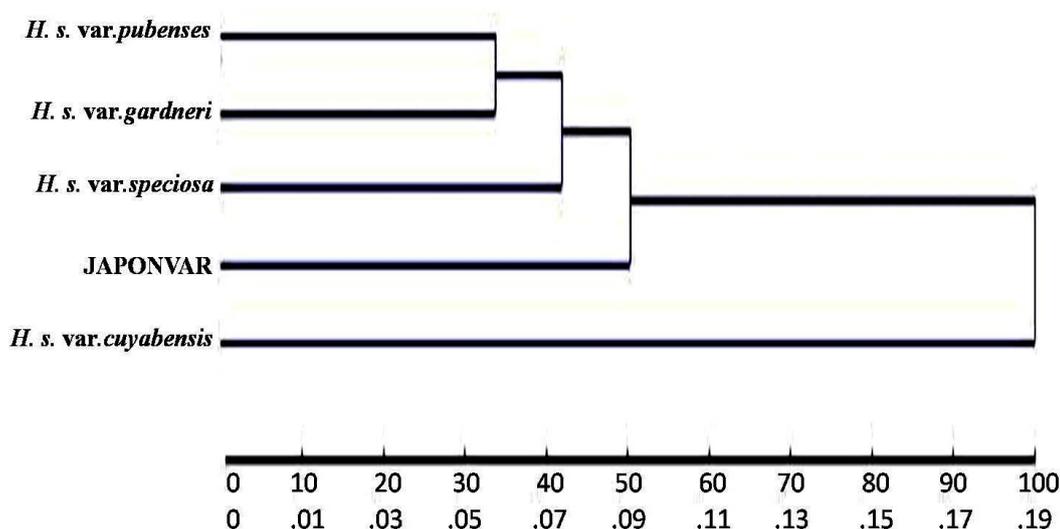


Figura 4.6 Dendrograma construído a partir da análise de seis locos microssatélites de *H. s. speciosa*, considerando como distância genética o valor da estimativa de N_{ST} par a par entre as variedades botânicas.

4.4 CONCLUSÕES

- ✓ Os locos avaliados apresentam alto índice de polimorfismo e são indicativos de diversidade genética elevada;
- ✓ O valor estimado tanto para F_{ST} quanto para N_{ST} foram indicativos da divergência genética entre as subpopulações, o que sugere um alto nível de diferenciação e restrição ao fluxo gênico;
- ✓ A distribuição da variabilidade ocorre de maneira aleatória, independente da distância geográfica, o que indica que não há estruturação genética das populações no espaço geográfico e reforça a hipótese de restrição ao fluxo gênico;
- ✓ Ao comparar a magnitude da diversidade genética entre variedades botânicas com a variabilidade total entre subpopulações, verifica-se que uma porção considerável desta variabilidade encontra-se entre subpopulações dentro de variedades botânicas, com aproximadamente 14% quando medida pelo F_{ST} e 13% com o N_{ST} ;
- ✓ Observa-se uma maior semelhança genética entre *H. s. var. gardneri* e *H. s. var. pubescens*. A variedade *H. s. var. cuyabensis* mostrou-se a mais divergente em

relação às demais; a população de Japonvar – MG não se agrupou com *H. s.* var. *speciosa*, o que corrobora a hipótese de esta pertencer a outra variedade botânica o que deve ser melhor investigado.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ A construção de biblioteca *TspI509* constitui estratégia eficiente na identificação de locos microssatélites para a espécie *Hancornia speciosa*.
- ✓ Os iniciadores desenhados, sintetizados e padronizados apresentam índice elevado de polimorfismo, resultando em ferramenta adequada pra ser utilizada em estudos de caracterização genética de populações da espécie.
- ✓ O valor obtido para H_e foi alto, o que é um indicativo de diversidade genética elevada.
- ✓ As subpopulações de *H. speciosa* apresentam considerável variabilidade genética estruturada entre as subpopulações, o que sugere restrição ao fluxo gênico.
- ✓ A distribuição aleatória da variabilidade genética, independente da distância geográfica, indica ausência de estruturação genética das subpopulações no espaço geográfico.
- ✓ As variedades botânicas *H. speciosa* var. *gardneri* e *H. speciosa* var. *pubescens* são as mais semelhantes entre si e a variedade *H. speciosa* var. *cuyabensis* apresenta a maior divergência em relação às demais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, L. M. S.; CAMARGO, A. J. A. (Ed.). **Cerrado: ecologia e caracterização**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados; Brasília: Embrapa Informação tecnológica, 2004. 249p.

ALHO, C. J. R.; MARTINS, E. S. **De grão em grão o Cerrado perde espaço**. Brasília: WWF, PRO-CER, 1995. 66p.

ALMEIDA, C. C. S.; ESPÍNDOLA, A. C. M.; CARVALHO, N. S. G.; SILVA, M. S. Variabilidade genética em mangabeira estimada através de caracteres morfológicos. *In*: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA. 1, 2003, Aracaju, **Resumos...** Aracaju: Embrapa – CPATC, 2003. 1 CD-ROM.

ALMEIDA JÚNIOR, E. B. **OTIMIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DA MANGABEIRA *Hancornia speciosa* Gomez** 2007. 37f. Monografia (Ciências Biológicas)-Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2008.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. 464p.

ALVES, R. M.. **Caracterização genética de populações de cupuaçuero, *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex. Spreng.) Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânico-agronômicos**. 2002. 146f. Dissertação (Doutorado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Goiânia, 2002.

ALVES, R. E.; CARNELOSSI, M. A. G.; SILVA, S. M.; FIGUEIREDO, R. W. Colheita e Pós-colheita. *In*: SILVA-JÚNIOR, J. F. & LÉDO (Ed.). **A cultura da Mangaba**. 1. ed. Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. v.1, cap.16, p. 207 a 220.

AULER, N.M.F. **Distribuição da Variabilidade Genética em Populações naturais de *Baccharis trimera* (LESS) DC. (CARQUEJA) no Sul do Brasil**. 2004. 125f. Tese (Doutorado em Agronomia). Centro de Ciência Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande Do Sul, 2004.

AZEVEDO V. C. R. **Desenvolvimento e aplicações de microssatélites, análise de cpDNA e modelagem computacional para estudos da estrutura dinâmica genética de maçaranduba – *Manilkara huberi* (Ducke) Chev. Sapotaceae**. 2007. 202f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular)-Instituto de Biologia Celular Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

AZEVEDO, V. C. R.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A. Y.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic Structure and Mating System of *Manilkara huberi* (Ducke) A. Chev., a Heavily Logged Amazonian Timber Species. **Journal of Heredity**, v. 98, n. 7, p. 646-654, 2007.

BARREIRA NETO, M. Recursos genéticos para o melhoramento da mangabeira no estado da Paraíba. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 1., 2003, Aracaju. **Resumos...** Aracaju: Embrapa – CPATC, 2003. 1 CD-ROM

BARROS, M.A.G.; CALDAS, L. S. Acompanhamento de eventos fenológicos apresentados por cinco gêneros nativos do cerrado. **Brasil florestal**, 10 (42):7-14, 1980.

BENSON, G.. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. **Nucleic Acids Res.** **27**:573–580.1999.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. uriphylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p. 816-827, 1998.

BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. **Manual Prático para o Desenvolvimento de Marcadores Microssatélites em Plantas**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília. 2007. 111p.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.V. Marcadores microssatélites em espécies vegetais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. n.30, p. 46-50, jan/jun. 2003.

CAPINAN, G. C. S. **Seleção de germoplasma de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) definidos por marcadores morfológicos e moleculares**. 2007. 152f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)- Universidade Federaldo Reconcavo da Bahia, Bahia, 2007.

CIAMPI, A. Y. **Desenvolvimento e utilização de marcadores microssatélites, AFLP e sequenciamento de cpDNA, no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de copaíba (*Copaifera lansdorffii*) em matas de faleria no Cerrado**. 1999. 109f. Tese (Doutorado) – Universidade Paulista, Botucatu, SP. 1999.

CIAMPI, A. Y.; BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. Desenvolvimento de Marcadores Microssatélites para *Copaifera lansdorffii* Desf. (Copaíba) – Leguminosae-Caesalpinioideae e Otimização de Sistemas Fluorescentes de Genotipagem Multiloco. **Boletim de Pesquisa 16**. Embrapa Cenargen, Brasília DF, 40p. 2000.

CIAMPI, A. Y.; VINSON, C. C.; GAIOTTO, F. A. Estimativa da diversidade genética em arbóreas nativas tropicais utilizando microssatélites. In: NASS, L. L. (ed.) **Recursos genéticos vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, p. 421-440, 2007.

CHAVES, L. J. Melhoramento e conservação de espécies frutíferas do Cerrado. In: 1º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Goiânia, 2001. **Anais...** Goiânia: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2001. 7p. 1 CD-ROM

CHAVES, L. J. Recursos Genéticos no Cerrado. In: SILVA-JÚNIOR, J. F. & LÉDO (Ed.). **A cultura da Mangaba**. 1. ed. Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. v.1, cap.5, p. 75 a 84.

CHAVES, L.J.; MOURA, N.F. Recursos genéticos da mangabeira no bioma Cerrado In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 1, 2003, Aracaju. **Resumos...** Aracaju: EMBRAPA - CPTAC, 2003. p. 1-10. 1 CD-ROM

CHAVES, L. J.; NAVES, R. V. **O Cerrado do Brasil:** Uma fonte potencial de recursos genéticos. In: Encontro sobre temas de genética e melhoramento, 15. Piracicaba: ESALQ – USP, v. 15, p 74-86. 1998.

COELHO, A. S. G.; VALVA, F. D. O processo evolutivo e o melhoramento de plantas. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. VALADARES-INLIS, M. C. (Eds.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas.** Rondonópolis: Fundação MT. 2001. P. 58-78.

COLLEVATTI, R. G.; BRONDANI, R. V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity** 83(6):748-756.1999.

CONDIT R, HUBBELL SP . Abundance and DNA-sequence of 2-base repeat regions in tropical tree genomes. **Genome** 34(1):66-71, 1991.

COSTA, S. S. **Caracterização genética de populações naturais de cajuzinho do Cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz.).** 2004. 70f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade federal de Goiás, Goiania, 2004.

CRESTE, C.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Report**, v. 19, p. 299-306, 2001.

DARRAULT, R. O.; SCHLINDWEIN, C. Polinização. In: SILVA-JÚNIOR, J. F. & LÉDO (Ed.). **A cultura da Mangaba.** 1. ed. Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. v.1, cap.3, p. 44 a 56.

DIAS, L. A. S.; KAGEYAMA, P. Y. Variação genética em espécies arbóreas e conseqüências para o melhoramento florestal. **Agrotropica**, Ilhéus, v. 3, n.3, 119-127, 1991.

EITEN, G. A. Vegetação do Cerrado: In: PINTO, M.N. (Org.). **Cerrado:** caracterização, ocupação e perspectivas. 2 ed. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 1993. p. 17-73.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 435-445, 2004.

EMBRAPA - **2007.** Disponível em: < <http://www.unb.br/fs/farmacognosia/index.php>> Acesso em: 10 de abril de 2009.

EPPLEN, J. T.; MCCARREY, J. R.; SUTOU, S.; OHNO, S. Base sequence of a cloned snake W-cromossome DNA fragment and indentification of a male-specific putative

mRNA i the mouse. **Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 79, n. 12, p. 3798-3802, 1982.

ESPINDOLA, A. C. M; FERREIRA, E. G. Nutrição Mineral e Adubação. In: SILVA-JÚNIOR, J. F. & LÉDO (Ed.). **A cultura da Mangaba**. 1. ed. Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. v.1, cap.12, p. 159 a 168.

EXCOFFIER, L.. P. E. SMOUSE AND J. M. QUATTRO. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** 13 1: 479 -491.1992.

EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M. C. & GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res** 8, 175–185.1998.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res** 8, 186–194.1998.

FALCONER, D. S. **Introdução a genética quantitativa**. Viçosa: UFV, 1987. 279p.

FALEIRO, A. S. G.; FALEIRO, F. G.; LOPES, U. V.; MELO, G. R. P.; MONTERIO, W. R.; YAMADA, M. M.; BAHIA, R. C. S.; CORREA, R. X. Variability in cação selected by producers for resistance to witches broom on microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 4, p. 290-297, 2004.

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D., **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genética**. 3 ed. Brasília: Embrapa, 1998, 220p.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. 2ª. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 646 p.

GAIOTTO, F. A.; GRATTAPAGLIA, D.; BRONDANI, R. P. V. Microsatellite Markers for Heart of Palm – *Euterpe edulis* and *E. oleraceae* Mart. (Palmae). **Molecular Ecology**, v. 1, n. 12, p. 86-92, 2000.

GANGA, R. M. D. **Variabilidade de plantas e progênes de populações naturais de Hancornia speciosa Gomes do Cerrado**. 2008. 125f. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas)- Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

GIACOMETTI, D. C. Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil. In: Simpósio Nacional de Recursos genéticos de Fruteiras nativas, 1992, Cruz das Almas, BA. **Anais...** Cruz das Almas, BA: EMBRAPA/CNPMPF, 1993, p. 13-27.

GOLDSTEIN, D. B.; SCHLOTTERER, C. **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford University Press Inc., New York, 351p. 1999.

GOTTSBERGER, I. S.; GOTTSBERGER, G.. A polinização de plantas do cerrado. **rev. Brasil. Biol.**, 48 (4): 651-663. 1998.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M.; SUZUKI, D. T.; MILLER, J. H. **Introdução à Genética**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 743.

HALL, T. Bioedite version 5.0.6. Departmente of Microbiology, North Carolina State University, 2001.

HAMADA, H.; PEDRINO, M. G.; KAKUNAGA, T. A novel repeat element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v 79, p. 6465-6469, 1982.

HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 618-620, 2002.

HARR, B.; ZANGER, B.; SCHOTTERER, C. Removal of microsatellite interruptions by DNA replication slippage: Phylogenetic evidence from *Drosophila*. **Molecular Biology Evolucion**. New York, v. 117, p. 1001-1009, 2000.

IBGE. 2004. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/mapas_ibge/ > Acesso em: Acesso em: 10 de abril de 2009.

INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNISKY, J. J.; WHITE, T. J. PCR Protocols. A guide to Methods and Applications. San Diego: **Academic Press**, 1990.

KAGEYAMA C.; LEPSCH-CUNHA, D. Trópicos. In: DIAS B. F. S. (Ed.) **Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais**. Petrópolis: Editora Vozes, 2001.

KANASHIRO, M. Genética e melhoramento de essências florestais nativas: aspectos conceituais e práticos. **Revista do Instituto Florestal**, 4: 1168-1178. 1992.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A. **A conservação do cerrado brasileiro. Megadiversidade**. Brasília, v. 1, n.1, p.147-155, jul 2005.

LEDERMAN, I. E.; BEZERRA, J. E. F. Situação Atual e Perspectivas da Cultura. In: SILVA-JÚNIOR, J. F. & LÉDO (Ed.). **A cultura da Mangaba**. 1. ed. Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. v.1, cap.19, p. 247 a 253.

LEMES, M. R.; BRONDANI, R. P. V.; GRATAPAGLIA, D. Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis of Mahogany, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), a threatened neotropical timber species. **The Journal of Heredity**, v. 93, n. 4, p. 287-290, 2002.

LEMO, E. E. P.; COSTA, M. A. P. C.; ALOUFA, M. A. I.; LÉDO, A. L.; ALMEIDA, W. A. B.; DANTAS, A. C. V. L.; SILVA, S. A.; SOUZA, F. V. D. Micropropagação. In:

SILVA-JÚNIOR, J. F. & LÉDO (Ed.). **A cultura da Mangaba**. 1. ed. Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. v.1, cap.9, p. 125 a 133.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v.44, p.388-396, 1989.

MACHADO, R. B.; RAMOS NETO, M. B.; PEREIRA, P. G. P.; CALDAS, E. F.; GONÇALVES, D. A.; SANTOS, N. S.; TABOR, K.; STEININGES, M. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Brasília-DF: Conservação Internacional, 2004.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E.; FAGG, C. W. Flora Vascular do Bioma Cerrado: Checklist com 12.356 espécies. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Eds.). **Cerrado: ecologia e flora**, Brasília: Embrapa, 2008, v. 2, p. 421-442.

MAYR, E. **Populações, espécies e evolução**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1970. 485p.

MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: S. C. K. MILACH (ed.). **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 17-28.

MONACHINO, J. A revision of *Hancornia* (Apocynaceae). **Lilloa**, Tucumán, v. 11. P. 19-48. 1945

MORAES, P.L.R., MONTEIRO, R.; VENCOVSKY, R. Conservação genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) na Mata Atlântica do estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* 22(2):237- 248. 1999.

MOREIRA, A. G. Effects on fire protection on savanna structure in Central Brazil. **Journal of Biogeography**, v. 27, n. 4, p. 1021 – 1029, 2000.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR- amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v. 3, p. 175-182, 1993.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, New York, v. 30, p.194-200, 2002.

MOURA, N. F. **Estrutura genéticas de subpopulações de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) nos cerrados do Brasil Central** . 2003. 70f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas)- Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2003.

MOURA, N. F.; CHAVES, L. J.; VENCOVSKY, R.; ZUCCHI, J. B.; MORAIS, L. K.; MOURA, M. F. Seleção de marcadores RAPD para estudo da estrutura genética de

populações de *Hancornia speciosa* Gómez. **Uberlândia Biosci. J.** v.21, n.3 p.119-125, 2005.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. **Methods Enzymol.**, New York, v.155, p.335-350, 1987.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B. da.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NARAIN, N.; FERREIRA, D. S.; ARAGÃO, G. C.; ARAGÃO, W. M. Tecnologia do Processamento do Fruto. In: SILVA-JÚNIOR, J. F. & LÉDO (Ed.). **A cultura da Mangaba**. 1. ed. Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. v.1, cap.17, p. 221 a 232.

NASCIMENTO, J. L. do; MAGALHÃES, L. A. F.; NAVES, R. V.; SILVA, S. M. C.; CAMPOS, L.A. Desenvolvimento vegetativo e produção da mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), sob condição de irrigação e adubação. In: Anais do Simpósio Brasileiro Sobre a Cultura da Mangaba, 1., 2003, Aracajú. **Resumos...** Aracajú: Embrapa – CPATC, 2003. 1 CD-ROM.

NAVES, R. V. **Espécies frutíferas nativas dos cerrados de Goiás: caracterização e influência do clima e dos solos**. 1999. 206 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Produção Vegetal) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1999.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, Chicago, v.106, p.283-292, 1972.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590, 1978.

NOGUEIRA, R. J. M. C., ALBUQUERQUE, M. B. Ecofisiologia. In: SILVA-JÚNIOR, J. F. & LÉDO (Ed.). **A cultura da Mangaba**. 1. ed. Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. v.1, cap.2, p. 36 a42.

NUCCI, S. M. **Desenvolvimento, caracterização e análise da utilidade de marcadores microssatélites em genética de populações de Macaúba**. 2007. 82f. Tese (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Campinas, 2007.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; LIMA, J. E. F. W. **Potencial de Impactos da Agricultura sobre os Recursos Hídricos na Região dos Cerrados**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, n. 56, 2002. 50p.

PEREIRA, A.; PEREIRA, E. B. C.; ARAÚJO, I. A.; V. JUNQUEIRA, N. T. V.Propagação por Enxertia. In: SILVA-JÚNIOR, J. F. & LÉDO (Ed.). **A cultura da Mangaba**. 1. ed. Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006a. v.1, cap.8, p. 111 a 124.

PEREIRA, E. B. C.; PEREIRA, A. V. JUNQUEIRA, N. T. V. Propagação por Sementes. In: SILVA-JÚNIOR, J. F. & LÉDO (Ed.). **A cultura da Mangaba**. 1. ed. Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006b. v.1, cap.7, p. 91 a 109.

PEREIRA, M. F. **Desenvolvimento de marcadores moleculares SSR e caracterização genética de populações naturais de *Annoma crassiflora* Mart. Do estado de Goiás**. 2007. 152f. Dissertação (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N.; MACEDO, E. C.; ALLOUFA, M. A. I. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de cultura. **Rev. Bras. de Fruticultura**, Jabotical, v.23, n.2, p413-416, 2001.

PINHEIRO, E.; PINHEIRO, F. S. V.; Produção de Borracha. In: SILVA-JÚNIOR, J. F. & LÉDO (Ed.). **A cultura da Mangaba**. 1. ed. Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. v.1, cap.18, p. 233 a 245.

PINTO, M. N. (Ed.). **Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas**. 2° ed. Bras. Editora Universidade de Brasília. 1993. 681p.

PRIMACK, R.; RODRIGUES, E. Biologia da Conservação. Efraim Rodrigues, Londrina. 2001. 328 p.

PONS, O.; PETIT, R. J. Measuring and testing genetic differentiation with ordered vs. unordered alleles. **Genetics**, v. 144, p. 1237- 1245, 1996.

RAFALSKI, J. A.; MORGANTE, M. POWELL, W. VOGEL, J. M. TINGEY, S. V. Generating and using DNA marks in plants. In: BIRREN, B. & LAI, E. (edes.) Analysis of non mammalian genomes – a practical guide. **Academic Press**. New York, p. 75-134, 1996

REZENDE, C. F. A.; NAVES, R. V.; CHAVES, L. J.; MOURA, N. F.; AGUIAR, A. V. de. Caracterização de ambientes com alta densidade e ocorrência natural de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) no Cerrado. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 1., 2003, Aracaju. **Resumos...** Aracaju: Embrapa- CPATC, 2003. 1. CD-ROM.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de. **Cerrado: Ambiente e Flora**. Planaltina: Embrapa/CPAC, 1998. p 87-166. p.289-556

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. As Matas de Galeria no contexto do bioma Cerrado. In: RIBEIRO, J. F.; FONSECA C. E. L. da; SOUSA-SILVA, J. C. (Ed.). **Cerrado: caracterização e recuperação de matas de galeria**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2001. cap. 1, p 28-47.

RIZZO, J. A. **Flora do Estado de Goiás: plano de coleção**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 1981. 35p.

RIZZO, J. A.; FERREIRA, H. D. *Hancornia* G. no estado de Goiás. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTANICA, 36, 1985, Curitiba, PR. **Anais...** Brasília: Sociedade Botânica do Brasil/IBAMA, 1990, v. 1, p. 363-368.

ROZEN, S., SKALETSKY, H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. **Humana Press**, Totowa, NJ, 365-386. 2000.

ROHLF, F. J. **NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System** (software). New York: Exeter publishers, 1986-1998.

SALOMÃO, A. N.; ALLEM, A. C. Polyembryony in angiospermous trees of the Brazilian Cerrado and Caatinga vegetation. *Acta Botanica Brasilica*, v. 15, n. 3, p. 369-378. 2001.

SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. Cerrado: Ambiente e Flora Planaltina EMBRAPA – CPAC. 1998. Xii + 556 p.

SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Eds.). **Cerrado: ecologia e flora**, Brasília: Embrapa, 2008, v. 1 e 2.

SILVA JUNIOR, J. F. Recursos genéticos da mangabeira nos tabuleiros costeiros e baixada litorânea do nordeste do Brasil. In *Simpósio Brasileiro sobre a cultura da mangava*, 1., 2003, Aracaju. **Resumos...** Aracaju: Embrapa – CPATC, 2003. 1 CD-ROM.

SILVA JUNIOR, J.F. A cultura da mangaba. **Rev. Bras. Frutic.**, v.26, n.1, Jaboticabal, 2004.

SILVA JUNIOR, J. F.; ARAÚJO, I. A.; BARREIRA-NETO, M.; ESPÍNDOLA, A. C. M.; CARVALHO, N. S. G. MOTA, D. M. Recursos Genéticos nos Tabuleiros Costeiros e Baixada Litorânea do Nordeste. In: SILVA-JÚNIOR, J. F. & LÉDO (Ed.). **A cultura da Mangaba**. 1. ed. Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. v.1, cap.4, p. 58 a74.

SILVA JÚNIOR, J. F.; LÉDO, A. S. Botânica. In: SILVA JUNIOR, J. F. & LÉDO (Ed.). **A cultura da Mangaba**. 1. ed. Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. v.1, cap.1, p. 26 a33.

SILVA JUNIOR, J. F.; SIMEÃO, F. R.; LÉDO, C. A. S. NEVES JUNIOS, J. S. N.; MOTA, D. M. da; SCHMITS, H.; MUSSER, R. S.; LÉDO, A. S. VARIABILIDADE EM POPULAÇÕES NATURAIS DE MANGABEIRA DO LITORAL DE PERNAMBUCO. **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 19, n. 4, p. 373-378, out./dez., 2007.

SILVA, J. A.; SILVA, D. B.; JUNQUEIRA, N. T. V. ANDRADE, L. R. M. **Coleta de sementes, produção de mudas e plantio de espécies frutíferas antivas dos cerrados: informações exploratórias**. Planaltina: Embrapa- CPAC, 1997. 23p.

SILVA, M. N. **Caracterização genética de populações naturais de *Hancornia speciosa* Gomes pela análise de polimorfismo de cpDNA**. 2006. 152f. Dissertação (Mestrado em

Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas)- Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v. 139, p. 457–462, 1995.

SOARES, T. N. **Estrutura genética populacional e fluxo gênico em *Dipteryx alata* VOGEL (Fabaceae) no Cerrado. 2009. 110f** . Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 704p, 2008

SREENU, V.B., ALEVOOR, V., NAGARAJU, J., NAGARAJARAM, H.A. MICdb: database of prokaryotic microsatellites. **Nucleic Acids Res.**, 31, 106–10. 2003.

STEARNS, S.C.; R. F. HOEKSTRA. **Evolução: Uma introdução**. São Paulo, Atheneu, 2003. 379p.

TAUTZ, D. S. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nuc. Acid. Res.**, New York: n.17, v.16, p6463-6471, 1989.

TELLES, M. P. C. **Diversidade genética e estrutura populacional de Cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) do sudeste de Goiás**. 2000. 129 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2000.

TELLES, M. P. C.; DINIZ-FILHO, J.A.F.; COELHO, A.S.G.; CHAVES, L.J. Autocorrelação espacial das frequências alélicas em subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC., Myrtaceae) no sudeste de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 145-154, jun. 2001a.

TELLES, M. P. C.; SILVA, R.S.M.; CHAVES, L.J.; COELHO, A.S.G.; DINIZ-FILHO, J.A.F. Divergência entre subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica*) em resposta a padrões edáficos e distribuição espacial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 11, p. 1387-1394, nov. 2001b.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J. PLEINIAK, F.; JEANMOUING, G.; HIBBINS, D. G. The Custal X Windows interface: flexible strategies ofr multiple sequence alignment aided bay quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 4876-4882, 1997.

VALVA, F. A.; COELHO, A. S. G. Estrutura genética das populações vegetais: estratégias adaptativas em plantas do Cerrado. In: XLIII Congresso Nacional de Genética, Goiânia: Sociedade Brasileira de Genética, **Resumos...** 1997, p. 37.

VENCOVSKY, R. Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasmas de espécies alógamas. **IPEF**, n.35, p.79-84, abr. 1987.

VENCOVSKY, R.; CROSSA, J. Measures of representativeness. In: BORÉM, A.; M. P. Giúdice e N. S. Sakiyama (Ed.) **Plant Breeding in the Turno f the Millennium**. Viçosa, UFV. 1999. P. 335-354.

VIEIRA NETO, R. D.; SILVA-JÚNIOR, J. F.; LÉDO, A. S.; PEREIRA, A. V.; PEREIRA, E. B. C. Implantação do Pomar e Práticas Culturais. In: SILVA-JÚNIOR, J. F. & LÉDO (Ed.). **A cultura da Mangaba**. 1. ed. Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. v.1, cap.11, p. 153 a 157.

YOUNÉS, T. Ciência da Biodiversidade. In: GARAY, L.; DIAS, B. F. S. (Ed.) **Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais**. Petrópolis: Editora Vozes, 2001, p.29-42.

WEBER, Z.; MAY, P. E. Abundante ca=lass of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **Annual Journal of Human Genetics**. V. 44, p. 388-396, 1989.

Weir, B. S. **Genetic data analysis II. Methods for discrete population genetic data**. North Caroline State University. Sinauer Associates Inc. Pub., Suderland, Massachusets, 1996. 445 p.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358-1370, 1984.

ZELANDI, E. M. **ESTRUTURA GENETICA DE POPULACOES NATURAIS DE Solanum lycocarpum ST HIL (SOLANACEAE) DO ESTADO DE SAO PAULO**. 2007. 65f. Tese (Doutorado Doutor em Ciencias Biologicas, Area de concentracao: Genetica) – Universidade Paulista Julio de Mesquita Filho, UNESP, BOTUCATU, 2006.

ZUCCHI, M. **Análise da estrutura genética de Eugenia Dysenterica DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. 130f. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

ZUCCHI, M.; BRONDANI R. V.; PINHEIRO J. B.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; VENCOVSKY R. Genetic structure and gene flow in Eugenia dysentericaDC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 4, p. 449-457, 2003.

7. ANEXOS

Anexo A. Croqui da coleção de frutíferas nativas do Cerrado da EA/UFG. Sementes provenientes de 109 matrizes de 35 regiões do Cerrado brasileiro (Goiás, Tocantis, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Bahia) foram utilizadas na implantação da coleção de germoplasma da espécie na EA/UFG em dezembro de 2005. O delineamento experimental usado foi o de blocos completos casualizados com 57 tratamentos, quatro repetições e uma planta por parcela no espaçamento de 5 m x 6m. Os tratamentos foram construídos por progênies de polinização livre (Ganga, 2008).

