

Horace Jose Jimenez

**Diversidade genética de populações naturais de mangabeira
(*Hancornia speciosa* Gomes) no estado de Pernambuco por meio
de marcadores moleculares**

Recife-PE
Janeiro/2014

Horace José Jimenez

**Diversidade genética de populações naturais de mangabeira
(*Hancornia speciosa* Gomes) no estado de Pernambuco por meio
de marcadores moleculares**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, na área de concentração Melhoramento Genético de Plantas (PPGAMGP), da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Agronomia.

COMISSÃO DE ORIENTAÇÃO:

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Luiza Suely Semen Martins – UFRPE

CO-ORIENTADORES:

Profa. Dra. Angélica Virgínia Valois Montarroyos - UFRPE

Prof. Dr. Edson Ferreira da Silva - UFRPE

Recife-PE

Janeiro/ 2014

Ficha Catalográfica

J61d Jimenez, Horace Jose
Diversidade genética de populações naturais de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) no estado de Pernambuco por meio de marcadores moleculares / Horace Jose Jimenez. – Recife, 2014.
53 f.

Orientadora: Luiza Suely Semen Martins.
Dissertação (Mestrado em Agronomia - Melhoramento Genético de Plantas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2014.
Inclui referências e anexo(s).

1. Recursos genéticos 2. Mangaba 3. Apocynaceae
4. ISSR I. Martins, Luiza Suely Semen, orientadora
II. Título

CDD 581.15

**“DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE
MANGABEIRA (HANCORNIA SPECIOSA GOMES) NO ESTADO
DE PERNAMBUCO POR MEIO DE MARCADORES
MOLECULARES”**

HORACE JOSÉ JIMENEZ

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em:
31/01/2014.

ORIENTADORA:



Dra. Luiza Suely Semen Martins
Professora DB/UFRPE

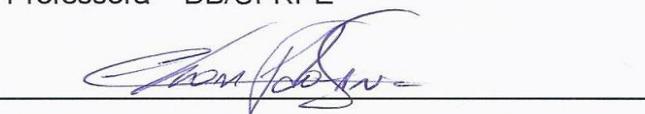
EXAMINADORES:



Dra. Walma Nogueira Ramos Guimarães
Professora Secretaria da Educação de Pernambuco



Dra. Nara Suze Aguiar de Freitas
Professora – DB/UFRPE



Dr. Edson Ferreira da Silva
Professor – DB/UFRPE

RECIFE – PE, BRASIL.

Janeiro, 2014

DEDICATÓRIA

“Ao meu pai, George Chavez Jimenez, a minha mãe, Solange Maria Jimenez, meu irmão Hugo Napoleão Jimenez e a minha querida noiva Pamela Mirela do Nascimento Alves pela total obstinação, carinho, amor e esforço para que eu me tornasse a pessoa que eu sou hoje”

AGRADECIMENTOS

- A Deus, em primeiro lugar, por ter me concedido a vida, me dado paciência e discernimento para enfrentar os percalços existentes nessa longa estrada.
- Aos meus pais e familiares, pelo companheirismo, compreensão, apoio e força durante toda essa caminhada em minha formação.
- A minha querida Pámela Mirela pela compreensão e amor.
- A Prof^ª. Dra. Luiza Suely Semen Martins, pelos conselhos e orientações.
- A Prof^ª. Dra. Angelica Virginia Valois Montarroyos sem a qual este projeto não poderia ter sido realizado.
- A Prof^ª. Dra. Ana Lilia Alzete pela permissão do uso do Laboratório genética Vegetal da FMRP – USP
- Ao Prof. Dr. Edson Ferreira da Silva, pela disponibilidade e pela simpatia.
- Ao Pesquisador Josué Francisco da Silva Junior da EMBRAPA por disponibilizar seu tempo nas viagens da coleta das mangabeiras.
- Aos meus companheiros de laboratório Yasodhara Capela, Alexandro, Guilherme e Adriana por todo apoio nas análises moleculares.
- Ao meu amigo Rômulo Maciel pelo apoio e ajuda nas análises moleculares.
- Aos meus companheiros de mestrado Ana Luiza e Ricardo Valadares pelo companheirismo e amizade durante esta jornada.
- Ao REUNI, pelo auxílio-financeiro e a EMBRAPA pela coleta e envio das amostras foliares processadas neste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. CENTRO DE ORIGEM E DIVERSIDADE DA MANGABEIRA (<i>Hancornia speciosa</i> Gomes).....	14
2.2. ASPECTOS BOTÂNICOS E DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE.....	15
2.3. IMPORTÂNCIA SÓCIO-ECONÔMICA DA MANGABEIRA.....	16
2.4. RECURSOS GENÉTICOS E MELHORAMENTO DA MANGABEIRA.....	17
2.5. MARCADOR MOLECULAR.....	18
2.5.1. ISSR - <i>Inter simple sequence repeat</i>	20
2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

CAPÍTULO II – Diversidade genética de populações naturais de mangabeira em Pernambuco por meio de marcadores moleculares

RESUMO.....	30
ABSTRACT.....	31
INTRODUÇÃO.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II – Matériel e Métodos

Figura 1 - Indicações dos locais de coleta dos indivíduos de mangabeiras (*Hancornia speciosa* Gomes) no Estado de Pernambuco, Brasil.

33

Capítulo II – Resultados e Discussões

Figura 2 - Padrão de bandas PCR – ISSR para os indivíduos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) utilizando-se o primer UBC #851.

37

Figura 3 – Análise de agrupamento de 38 indivíduos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), obtida por meio do programa NTSYSpc, usando a UPGMA. (Han= *Hancornia*).

38

Figura 4 – Análise de coordenadas principais (ACoP) para as diferentes localidades de indivíduos de mangabeiras (*Hancornia speciosa* Gomes) do Estado de Pernambuco. \diamond (vermelho): população 1, \square (verde): população 2 e Δ (azul): População 3.

41

Figura 5 - Valores de ΔK para cada valor de K, calculado para os 38 indivíduos de populações naturais de mangabeiras do Estado de Pernambuco. O maior valor de ΔK corresponde ao K ótimo.

42

Figura 6 - Relação de ancestralidade para os indivíduos de mangabeira das regiões analisadas, considerando-se a existência de sete clusters genéticos (K=7). População 1 (Indivíduo 1 – 20), população 2 (Indivíduo 21 – 38) e população 3 (Indivíduo 42 – 60).

43

LISTA DE TABELAS

Capítulo II – Material e Métodos

Tabela 1 – Indivíduos analisados de três populações naturais de mangabeiras (*Hancornia speciosa* Gomes) da zona da mata de Pernambuco, Brasil. UFRPE, 2013

34

Tabela 2 - Sequências dos *primers* ISSR utilizados no estudo de diversidade de 38 indivíduos de mangabeiras (*Hancornia speciosa* Gomes) do Estado de Pernambuco, Brasil. UFRPE, 2013

35

Capítulo II – Resultados e discussão

Tabela 3 – Variáveis usadas no estudo das populações de *Hancornia speciosa*, de três regiões da Zona da Mata do Estado de Pernambuco. NL: Número de loci, LP: Loci polimórficos, LM: Loci monomórficos, H_e : Diversidade genética de Nei (1978), Ht: Diversidade genética total, Hs: Diversidade média intrapopulacional. G_{st}: Coeficiente de Diferenciação, Nm: Numero de migrantes por geração.

39

Tabela 4 - Identidade genética de Nei (1978) e distância genética em três populações de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) no Estado de Pernambuco, Brasil. UFRPE, 2013

39

Tabela 5 – Análise de variância molecular dos 38 indivíduos de mangabeiras (*Hancornia speciosa* Gomes) localizadas no Estado de Pernambuco, Brasil. UFRPE, 2013

42

Tabela 6 - Proporção de ancestralidade de cada um dos sete clusters genéticos pré-estabelecidos (K=7) em cada uma dos indivíduos analisados.

43

RESUMO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), é uma fruteira nativa do Brasil, ocorrendo em maior abundância nos tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas do Nordeste. Seus frutos são amplamente consumidos in natura ou processados como sucos, sorvetes e geleias. A mangabeira, atualmente, vem apresentando seu germoplasma bastante ameaçado, devido a redução da sua área original de ocorrência, pelo desmatamento, especulação imobiliária e plantio de cultivos como cana-de-açúcar, coqueiros e pastagens. Assim sendo, a referida espécie é uma das fruteiras mais ameaçadas de extinção no Nordeste. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a diversidade genética de 38 indivíduos de mangabeiras de três populações do Estado de Pernambuco por meio da técnica de marcadores moleculares ISSR. Foram coletadas folhas nas regiões de Tamandaré, Carneiro, Ilha de Itamaracá, Nazaré e Reserva do Paiva. Com os dados foram realizadas análises de coordenadas principais, estrutura de populações e gerado um dendrograma relacionando todas as populações através do método UPGMA. Também foram calculados locos polimórficos, locos monomórficos, diversidade genética de Nei, parâmetros de heterozigosidade total, a heterozigosidade média dentro de grupos, coeficiente médio de diferenciação entre os grupos e número de migrantes por geração. Foram selecionados 6 primers ISSR e produzidos um total 93 locos, sendo 10 monomórficos e 83 polimórficos. A média de bandas polimórficas por primer foi de 11,5, onde o primer UBC#851 foi o mais polimórfico, apresentando 14 bandas. Ao cruzar as informações entre o agrupamento UPGMA, ACoP e a estrutura de população, os indivíduos *Hancornia* 56, *Hancornia* 57 e *Hancornia* 58 evidenciaram uma estreita relação entre eles. Os resultados mostraram um alto nível de diversidade genética dentro da espécie ($H_e = 0,30$), sendo verificado que a maior parte da variabilidade genética se encontra dentro das populações. O fluxo gênico estimado foi de 1,18, ratificando a informação de que as espécies arbóreas tropicais têm apresentado valores de N_m superiores a 1. As populações de *Hancornia speciosa* estudadas apresentaram altos níveis de diversidade genética, a maioria dos quais se encontra dentro das populações.

Palavras-chave: Recursos genéticos; mangaba; Apocynaceae; ISSR.

ABSTRACT

The Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) is a native fruit tree from Brazil, occurring in greater abundance in coastal and coastal plains of the Northeast region . Its fruits are widely consumed in natura or processed as juices, ice creams and jellies. Currently the genetic diversity of the species is largely threatened due to reduction of its original area of occurrence, deforestation , land speculation and planting crops such as sugar cane, coconut and pastures. Thus, the species is one of the most endangered fruit plants in the Brazilian northeast . The objective of this study was to evaluate the genetic diversity of 38 *H. speciosa* genotypes from three populations of Pernambuco State through ISSR molecular markers . Leaves were collected in regions of Tamandaré Itamaracá , Nazaré and Paiva. We performed population structure analysis, Principal Coordinate Analysis, and a UPGMA dendrogram with all genotypes. Number of polymorphic loci, number of monomorphic loci, Nei's genetic diversity, total heterozygosity , mean heterozygosity within groups , mean coefficient of differentiation between groups and number of migrants per generation were also calculated . Six ISSR primers were selected and produced a total 93 loci, 10 monomorphic and 83 polymorphic . The average number of polymorphic bands per primer was 11.5 , where UBC primer # 851 was the most polymorphic , with 14 bands . By cross checking between the UPGMA clustering , PCoA and structure of population, *Hancornia* 56 , 57 and *Hancornia* 58 subjects showed a close relationship between them . The results showed a high level of genetic diversity within species ($H_e = 0.30$), and found that most of the genetic variability found within a population . The gene flow was 1.18 , confirming information that tropical tree species have shown values of N_m greater than 1. *Hancornia speciosa* populations studied showed high levels of genetic diversity , most of which lies within populations .

Keywords: genetic resources; mangaba; Apocynaceae; ISSR.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO GERAL

A fruticultura é um importante setor do agronegócio brasileiro, pois envolve mais de cinco milhões de pessoas que trabalham de forma direta e indireta no setor. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, com colheita em torno de 1.580.795.000 frutos ao ano, mas participa com apenas 2% do comércio global do setor, o que demonstra o forte consumo interno (Anuário Brasileiro de Fruticultura, 2013).

O Brasil cultiva frutíferas de clima temperado (Sul e Sudeste) e de clima tropical e subtropical (Centro-Oeste, Sudeste, Norte e Nordeste), colocando-se em destaque em relação aos demais países do mundo, existindo ainda grande potencial para algumas frutas nativas das diversas regiões do país. Os frutos nativos ocupam lugar de destaque no ecossistema brasileiro, pois muitos deles são comercializados e consumidos “*in natura*” ou beneficiados pelas indústrias caseiras (Silva et al., 1994).

Dentre as fruteiras nativas da região Nordeste de maior interesse pelas agroindústrias, a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), vem se destacando. Ocorre em solos arenosos onde apresenta tolerância a seca e consegue se desenvolver bem em solos com baixo teor de matéria orgânica, acidez elevada e baixa disponibilidade de nutrientes (Ferreira & Marinho, 2007)

A comercialização do fruto geralmente ocorre nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, e na maioria destes Estados a produção é proveniente das plantas remanescentes, exploradas por comunidades extrativistas (Lederman et al., 2000). A comercialização dos frutos até o consumidor final é feita pelos mercados em bandejas de isopor revestidas com filme PVC, com capacidade para 500g (Lederman et al, 2000).

Devido a grande demanda pelos produtos da mangabeira, há necessidade de pesquisas para solucionar os problemas tecnológicos que impossibilitam a exploração comercial dessa fruteira, como por exemplo: os métodos de propagação, porte da árvore, forma de colheita, manejo, sistemas de plantio, são algumas das barreiras que causam algum tipo de problema para implantação de pomares comerciais, e para tanto, existe a necessidade de estudos para sua caracterização e consequente seleção de materiais genéticos de interesse econômico (Silva Júnior et al., 2007).

A presente pesquisa teve como objetivo a análise de populações de 38 indivíduos de mangabeira de três populações do Estado de Pernambuco, por meio da técnica de marcadores moleculares ISSR, com a finalidade de se conhecer a diversidade genética dentro e entre as populações naturais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CENTRO DE ORIGEM E DIVERSIDADE DA MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes)

As espécies da família Apocynaceae, num total de 5100, distribuídas em 450 gêneros, são encontradas naturalmente na vegetação do cerrado e nordeste brasileiro, onde são caracterizadas normalmente pela presença de látex. Os gêneros mais conhecidos são: *Allamanda*, *Aspidosperma*, *Plumeria*, *Rauwolfia*, *Taberna*, *Montana* e *Hancornia* (Lorenzi, 2002).

O gênero *Hancornia* é monoespecífico e pertence ao grupo das Eudicotiledoneas, ordem *Gentianales*, onde a espécie *Hancornia speciosa* Gomes compreende seis variedades botânicas que se diferenciam por algumas características morfológicas, principalmente da folha e da flor: *H. speciosa* var. *speciosa*, *H. speciosa* var. *maximiliani*, *H. speciosa* var. *cuyabensis*, *H. speciosa* var. *lundii*, *H. speciosa* var. *garneri* e *H. speciosa* var. *pubescens*. (Monachino, 1945; Soares et al., 2009). No Nordeste registra-se com maior intensidade a variedade *speciosa*; a *gardneri* ocorre no Brasil Central; a *pubescens* em Goiás e Minas Gerais; a *cuyabensis* no Mato Grosso, na Chapada dos Guimarães; a *maximiliani* em Minas Gerais e a *lundii* ocorre em Minas Gerais, Pernambuco, Bahia e Goiás.

Sendo a mangabeira uma planta originária do Brasil, Giacometti (1993) propôs os seguintes centros de diversidade da mangabeira: Centro 2 – Costa Atlântica e Baixo Amazonas (Pará e Amapá); Centro 6 - Nordeste / Caatinga (tabuleiros); Centro 8 - Brasil Central / Cerrado; Centro 9 - Mata Atlântica sobretudo os setores 9A (ecossistemas da costa do Rio Grande do Norte a Alagoas) e 9B (litoral de Sergipe ao Espírito Santo); Centro 10 - Brasil (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) / Paraguai, que inclui o complexo do Pantanal.

Vieira Neto (2002) relata que é nas regiões Centro-Oeste, tabuleiros e baixadas litorâneas do Nordeste que a mangabeira apresenta maior diversidade, onde se encontra quase a totalidade da produção nacional devido ao seu mais intenso extrativismo.

A palavra mangaba é de origem indígena e significa “coisa boa de comer” (Silva Júnior et al., 2006), o que significa a boa palatabilidade dos frutos e a aceitação da fruta na alimentação regional. Segundo Monachino (1945), são várias as denominações usadas para a mangaba no Brasil, como mangaíba, mangareíba, mangava, mangaúva, 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-catu e manga-icé. Em alguns Estados, como por exemplo Sergipe e Bahia, os frutos são

popularmente conhecidos como catu e fruta-de-doente, tembiú e tembiucatinga, respectivamente (Bahia, 1979). Por fim, em alguns países como Espanha e Portugal, Villachica et al. (1996) cita que são conhecidos como mangaba e mangabinha do norte, respectivamente.

A espécie ocorre como fruteira nativa e laticífera em solos arenosos onde apresenta tolerância a seca e consegue se desenvolver bem em solos com baixo teor de matéria orgânica, acidez elevada e baixa disponibilidade de nutrientes (Ferreira & Marinho, 2007). Pode ser encontrada em latossolos, areias quartzosas, cambissolos e litossolos. A planta vegeta bem em áreas que apresentam grande insolação, temperatura média em torno de 25°C e pluviosidade de 750mm e até mais de 1500 mm anuais.

2.2. ASPECTOS BOTÂNICOS E DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE

A mangabeira é uma planta arbórea de porte médio, com altura variando de 4 a 7 metros, podendo chegar até 15 metros, de crescimento lento, copa ampla, às vezes mais ramificada que alta, com galhos abundantes apresentando folhagens reduzidas (Silva Júnior & Lédo, 2006, Silva Júnior et al., 2007). O tronco possui 0,2 a 0,3m de diâmetro sendo tortuoso ou reto, casca suberosa com caule rugoso tendo, em média, 3 bifurcações situadas a partir de 40 a 50cm da altura da base. Os ramos jovens possuem coloração violácea, meio angulosos sendo curtos com poucas folhas. A raiz é do tipo pivotante profunda, circundada de raízes secundárias bem desenvolvidas, dispostas obliquamente em relação à principal e toda a planta exsuda látex de coloração branca ou róseo-pálida. As folhas são decíduas, simples alternas, opostas, elípticas, coriáceas com lâmina oblonga, oval e espaçadas, medindo 3,5 a 10,0cm de comprimento e 1,5 a 5,0cm de largura. São glabras nas duas faces, oliváceo-enegrescentes na face ventral, sendo a face dorsal descoradas, com medidas de pecíolo de 9 a 12mm, fino e axilar (Lederman et al., 2000).

Apresenta 2 a 5 flores hermafroditas gêmeas ou trigêmeas no ápice dos râmulos, campânuladas, isoladas e aromáticas. Estas são, em geral, de coloração branca, e posteriormente rósea ou amarela. Em relação ao androceu, são dotados de 5 estames epipétalos, anteras lanceoladas com 2mm de comprimento, filetes curtos e deiscência rimosa localizadas na região apical, sendo não fundidas, e a polinização é feita por insetos lepidópteros (Darrault & Schlindwein, 2002). O gineceu possui ovário pequeno (2mm de comprimento), unilocular, pluriovular e glabro, sendo seu estilete longo com estigma em carretel (Monachino, 1945). Os frutos são arredondados ou piriforme (forma de pera), com 2,0 a 6,0cm de comprimento, exocarpo exibindo uma coloração que varia de verde-clara a amarelada, com estrias amareladas ou avermelhadas. Quanto ao fruto, o mesmo

produz um suco viscoso na casca, sendo a polpa de cor branca de gosto acidulada a doce, suave, carnosa e viscosa, de aroma perfumado e muito saborosa (Soares et al., 2009). As sementes recalcitrantes, são discoides, achatadas, com 7- 8mm de diâmetro de coloração castanho-clara e rugosas, com hilo central possuindo a testa com coloração marrom-amarelada, fina e o endosperma branco triangular(Monachino, 1945).

A mangabeira é uma planta alógama (Dias & Maranhão, 1994) e apesar de suas flores serem hermafroditas, há uma auto-incompatibilidade entre as estruturas de reprodução, o que a torna obrigatoriamente dependente de polinizadores (Darrault & Schlindwein, 2002)

2.3. IMPORTÂNCIA SÓCIO-ECONÔMICA DA MANGABEIRA

A mangabeira apresenta, no litoral do Nordeste, duas florações e frutificações durante o ano (Silva Júnior & Lédo, 2006), ocorrendo durante o período de agosto à novembro e dezembro à março, respectivamente. Bezerra et al. (1993) relatam que a época de produção de frutos em Pernambuco ocorre de dezembro a maio, com maior concentração entre os meses de janeiro e abril.

A mangabeira é uma planta cuja propagação se dá por via sexuada, havendo sérias dificuldades na sua propagação por via assexuada, devido ao insucesso de técnicas como estaquia, enxertia e mergulhia para mangabeiras em viveiros comerciais (Lederman et al., 2000; Vieira Neto, 2002; Lima et al., 2008; Gomes, 2010), embora para as variedades botânicas do cerrado já exista tecnologia para produção de mudas enxertadas (Pereira, 2006). Além disso, tem-se encontrado empecilhos no armazenamento das sementes, tendo em vista o seu caráter recalcitrante, presença de inibidores na polpa e a rápida perda de viabilidade. Por não poderem ser secas, devem ser semeadas até quatro dias após sua extração, pois podem sofrer desidratação em cerca de 30% no fruto (Soares et al., 2009). Diante disso, a sua conservação ex situ deva ser, obrigatoriamente, feita em coleções no campo (Tavares, 1960; Pimentel & Santos, 1978; Oliveira & Valio, 1992; Vieira Neto, 2002).

Lederman et al. (2000) afirmam que, aparentemente, a mangabeira apresenta pouca segregação, e apesar de ser propagada por semente, conserva muito do seu patrimônio genético. Dessa maneira, a erosão genética é baixa, e o germoplasma poderá se manter nessas condições com todo o seu potencial. Por ser uma espécie domesticada recentemente, é natural que ocorra diversificação em relação as características de produção, produtividade, porte, conformação de copa, ciclo reprodutivo e composição físico-química do fruto.

De acordo com Manica (2002), a mangaba é considerada uma fruta de excelente aroma e sabor quando madura, sendo frequentemente apreciada *in*

natura ou usada na elaboração de batidas, coquetéis. É comercializada na forma de polpa congelada, doce em calda, compota, geleia, refrescos, sorvete, sucos e xarope. Existe a possibilidade de ser utilizada no preparo de refresco em pó, como aditivo de bebidas derivadas do leite, e a polpa usada para o enriquecimento e mistura com outros sucos. Em relação a polpa, que é do tipo carnosu-viscosa de coloração branca, possui um aroma agradável com um alto rendimento na ordem de 93,7%, sendo sua utilização industrial cada vez mais difundida devido ao seu sabor exótico característico. Em relação ao valor nutritivo, a polpa apresenta teor proteico superior ao da maioria das espécies frutíferas (Ferreira et al., 2008). Quando a fruta é fermentada, produz vinho, vinagre, álcool e licor (Soares et al., 2009). O fruto pode amadurecer na planta ou após a colheita, sendo assim climatérico (Vieira, 1997).

Além de se utilizar o fruto da mangabeira, aproveita-se também o seu látex para a produção de borracha para exportação. O látex também tem ampla aplicação na farmacologia, caracterizando seu potencial diversificado de aproveitamento (Ferreira et al., 2008), podendo ser empregado no tratamento da tuberculose, úlceras, dermatoses, herpes, verrugas e desordem gástrica. A madeira do tronco, vermelha e rígida, é usada na construção civil, na carpintaria, lenha e carvão (Manica, 2002).

No Nordeste, a cultura é explorada predominantemente pela ação extrativista das populações tradicionais que trabalham com a mangaba como atividade econômica, onde Mota et al. (2005) realizando uma pesquisa no decorrer dos anos de 2003 e 2004 no litoral Sul sergipano com pequenos produtores, relataram que naquela região a importância da mangabeira cresceu nos últimos anos, fazendo com que o fruto seja considerado pela comunidade tradicional como uma espécie de “tábua de salvação”, gerando importante fonte de renda para os produtores.

2.4. RECURSOS GENÉTICOS E MELHORAMENTO DA MANGABEIRA

Muito pouco tem sido feito para preservar o germoplasma existente, tanto in situ quanto ex situ, da mangabeira embora esta esteja entre as espécies com alta prioridade para preservação da mangabeira pelo programa Plantas do Futuro do CNPq/World Bank/GEF/MMA/Probio, com potencial entre as fruteiras nativas do Nordeste (Ferreira et al., 2008). A cultura ainda está em fase de domesticação e, portanto, informações sobre o desenvolvimento e a variação genética de espécies nativas são fundamentais, já que a domesticação e a incorporação dessas espécies nos sistemas produtivos regionais, bem como o desenvolvimento de estratégias de conservação eficientes estão estreitamente relacionadas ao conhecimento da magnitude e da distribuição da variabilidade genética nas populações naturais. Todos os aspectos relacionados ao seu cultivo ainda

necessitam ser melhor estudados, podendo-se citar: propagação vegetativa, seleção de genótipos promissores, desenvolvimento e adaptação de práticas culturais, estudos sobre a fenologia da planta e aspectos relacionados com a pré e pós-colheita do fruto.

As áreas nativas de mangabeiras vêm perdendo espaço para os canaviais, coqueirais, pastagens, para os criatórios de camarão e especulação imobiliária materializada pela construção desordenada de grandes condomínios residenciais, hotéis, resorts, casas de veraneio e demais atividades ligadas ao turismo. Um dos exemplos mais graves está em Pernambuco. Estimativa feita pela Embrapa Tabuleiros Costeiros mostra que o Estado já perdeu 90% das áreas originais de mangaba (Alencar, 2007). A espécie vem sofrendo acelerado processo de erosão genética em razão dos vários processos antrópicos ao longo dos anos (Pinheiro, 2001). A inversão deste quadro é primordial para manutenção das populações naturais e a dinâmica ecológica do sistema, pois a erosão genética impossibilita o total conhecimento dos recursos genéticos da espécie e, por conseguinte, de toda variabilidade genética existente.

Os Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) são uma alternativa para a conservação, preservação e seleção dos recursos genéticos vegetais, pois segundo Nass et al. (2008), resulta em informações sobre potenciais genitores a serem utilizados em programas de melhoramento. Segundo Lemos et al. (2006), plantas elite podem estar se perdendo e a pesquisa científica precisa desenvolver meios para fixar vegetativamente estas, pois a mangabeira se encontra na lista de espécies em extinção (Ferro, 2011). O desenvolvimento de coleções de germoplasma é o primeiro passo para a identificação de duplicatas e genitores, que possibilitarão a obtenção de híbridos com maior potencial comercial.

Conforme relatado por Sousa et al. (2007), existem poucos bancos de germoplasmas de *H. speciosa* no país. O da EMEPA/PB (Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba), possui a maior coleção *ex situ* do país, com 311 acessos. O Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas possui uma coleção cujos acessos estão localizados no município de Rio Largo, Alagoas (Espíndola, 2003). A Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizada em Sergipe, no campo experimental de Itaporanga, possui 23 populações procedentes dos Estados da Bahia, Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Minas Gerais, Pará e Ceará, totalizando 271 genótipos.

2.5. MARCADOR MOLECULAR

Os estudos de genética de populações avançaram significativamente na década de 1970 com o advento das técnicas moleculares, o que permitiu a análise da variação dos organismos ao nível de DNA, observando diferenças nas sequências gênicas com uso de marcadores moleculares (Zucchi et al., 2002),

eliminando assim possíveis efeitos ambientais. Sendo assim, marcadores moleculares são fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos geneticamente diferentes (Borém & Caixeta, 2006) e tem propiciado informações sobre sequências desejadas, clonagem de genes, construção de árvores filogenéticas, genes condicionantes de características de interesse e mapeamento genômico (Oliveira, 2010).

Os primeiros marcadores a serem utilizados foram os morfológicos, que são marcadores determinados por fenótipo de fácil identificação visual, normalmente identificados por um único loco e geralmente apresenta herdabilidade igual a 1,0 (Ramalho et al., 2008). No entanto, seu uso se tornou limitado devido ao pequeno número de marcadores, a influência do ambiente na sua expressão, nem sempre possuem herdabilidade igual a 1 e são frequentemente controlados por alelos dominantes (Freitas & Bered, 2003).

As isoenzimas, também chamadas de isozimas, foram primeiramente descritas por Markert e Moller (1959) para designar formas moleculares múltiplas de enzimas com a mesma especificidade enzimática. Elas podem ser distinguidas por carga ou tamanho, são controladas geneticamente por um ou vários genes em locos diferentes.

Entretanto, as isoenzimas apresentam limitações como cobertura parcial do genoma, baixo nível de polimorfismo, atividade isoenzimática diferenciada de acordo com estágio de desenvolvimento da planta, influência das condições ambientais e tipos de tecidos vegetais utilizados (Alfenas, 1998; Borém & Caixeta, 2006; Faleiro, 2006). Dez anos após a aplicação dos descritores de enzimas e proteínas surgiram outros mais eficazes, baseados em DNA. Enquanto os marcadores de proteína flanqueiam apenas regiões de expressão gênica, os marcadores de DNA realizam uma ampla cobertura do genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Existem vários tipos de marcadores de ácidos nucleicos disponíveis, sendo os mesmos divididos em dois grupos conforme a metodologia de identificação: hibridização e amplificação. Os principais marcadores identificados por hibridização são RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") e Minissatélites ou locus VNTR ("Variable Number of Tandem Repeats"). Outros como RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"), SSR (Simple Sequence Repeat"), AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism"), SCAR ("Sequence Characterized Amplified Regions) e STS ("Sequence Tagged Sites") são revelados por amplificação, via PCR (" Polymerase Chain Reaction") (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Caixeta et al., 2009).

São raros os trabalhos sobre divergência genética de mangabeiras com uso de marcadores moleculares e morfológicos. Os primeiros iniciadores de RAPD, para a avaliação da estrutura genética de populações de *H. speciosa* do Cerrado, foram selecionados por Moura et al. (2005). Ganga (2008), ao estudar a variabilidade de plantas e progênies de populações nativas de *H. speciosa* no

Cerrado, verificou elevado nível de variação fenotípica quanto aos caracteres de frutos e de crescimento. Moura et al. (2008), utilizando marcadores moleculares RAPD, observaram variação significativa entre *H. speciosa* var. *pubescens* e *H. speciosa* var. *gardneri*, tendo validado o uso de marcadores RAPD para o estudo da estrutura genética de populações de mangabeira.

2.5.1. ISSR - *Inter Simple Sequence Repeat*

Os ISSR (*Inter simple sequence repeat*) são marcadores arbitrários *multiloci* que envolve a amplificação de DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), usando um único primer composto de uma sequência de microssatélite (Gonzalez et al., 2005). A utilização dessa técnica supera a limitação do conhecimento prévio das sequências dos microssatélites. Estes marcadores são simples, económicos, altamente polimórficos, reprodutíveis e confiáveis, ideais para “fingerprinting” de todas as espécies (Bornet e Branchard, 2001) e apresentam elevada resolução entre populações e indivíduos (Tsumura et al., 1996; Yang et al., 1996; Wolfe et al., 1998; Smith e Bateman, 2002).

A reação de PCR-ISSR utiliza um único *primer* geralmente longo e constituído por sequências de “di” ou “tri” nucleotídeos. O produto da reação de PCR são sequências de diferentes tamanhos localizadas entre duas regiões repetidas de microssatélites idênticas orientadas em direções opostas (Wolfe et al., 1998). O comprimento desses *primers* varia entre 16 a 25 pares de bases (pb) e o tamanho dos produtos amplificados concentra-se entre 200 a 2000 pb. Para separação e visualização dos produtos da amplificação pode ser utilizada eletroforese em gel de agarose e coloração com brometo de etídeo (Joshi et al., 2000) ou eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração com nitrato de prata (Blair et al., 1999).

Os ISSRs são principalmente transmitidos como marcadores genéticos dominantes e raramente como co-dominantes, sendo estes últimos casuais (Rakoczy-Trojanowska & Bolibok, 2004; Semagn et al., 2006). Porém são mais vantajosos que o RAPD, pois os “primers” são maiores e a temperatura de anelamento é mais elevada que costuma variar de 45 a 65°C, sendo sua otimização influenciada pela quantidade de guanina e citosina (GC) presente no primer (Reddy, 1995).

A desvantagem deste método é a natureza dominante do marcador pois a presença da banda pode representar o homocigoto dominante ou o heterocigoto, admitindo-se que sua ausência seja o homocigoto recessivo, entretanto, a presença ou não da banda pode estar relacionada com ocorrência de inserções ou deleções no sítio de ligação do primer (Zietkiewicz et al., 1994; Culley & Wolfe, 2001).

Marcadores ISSRs têm sido usados para diversos fins, tais como, inferências filogenéticas (Joshi et al. 2000; Dogan et al. 2007), avaliação da diversidade genética (Batista et al. 2008; Aguilera et al. 2011), estudos taxonômicos para delimitação de espécies complexas (Schneider, 2009; Rodrigues, 2010; Michelan et al., 2012), caracterização de cultivares (Almeida et al., 2009) e estudos populacionais (Merrill et al., 2012), entre outros.

Entre os marcadores que podem estimar a diversidade genética, observa-se o uso frequente de marcadores dominantes como ISSR, RAPD e AFLP. Isso ocorre devido à capacidade que os marcadores possuem para detectar polimorfismo sendo importantes em estudos de variabilidade genética (Borém e Caixeta, 2006). São poucos os trabalhos feitos com marcadores ISSR para estudo de diversidade genética entre vegetais da família Apocynacea. Faisal et al. (2005) avaliaram 9 acessos de *Rauvolfia*, onde foram encontrados acessos altamente similares e outros bem divergentes. Ibrahim et al. (2013) estudaram a diversidade genética de 6 cultivares de *Catharanthus roseus* e obtiveram bons valores de similaridade, baseados em dados de ISSR, concluindo que a técnica apresentou grande distinção entre todas as cultivares de *C. roseus*, sendo de grande potencial na identificação de cultivares.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, J. G. et al. Genetic variability by ISSR markers in tomato (*Solanum lycopersicon* Mill.). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 6, n. 2, p. 243–252, 2011.

ALENCAR, G. **Pesquisas mostram que mangaba está ameaçada em estados do Nordeste**. Embrapa, abril de 2007. Disponível em:< http://www.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/2007/abril/foldernoticia.2007-04-09.3971798158/noticia.2007-04-13.9554356391/mostra_noticia>. Acesso em: 28 de junho de 2007

ALFENAS, C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.

ALMEIDA, C. M. A. et al. Caracterização Molecular de Cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras: UFLA v. 33, n. 1, p. 1771–1776, 2009.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2013. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2010. 129 p.

BAHIA. Secretaria de Agricultura. **Inventário de plantas medicinais do Estado da Bahia**. Salvador, 1979. p.679-680.

BATISTA, E. C. et al. 2008. Variabilidade genética intrapopulacional utilizando marcadores ISSR em *Tibouchina papyrus*. In: SIMPÓSIO NACIONAL CERRADO E II SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS, 9, Brasília-DF. **Anais ... Brasília-DF, Brasil**

BEZERRA, J. E. F. et al. Conservação in vivo de germoplasma de fruteiras tropicais nativas e exóticas em Pernambuco. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTEIRAS NATIVAS, 1993, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: Embrapa-CNPMPF, 1993. p. 93-99.

BLAIR, M. W.; PANAUD, O.; MCCOUCH, S. R. Intersimple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**. Georgia, v. 98, n. 5, p. 780-792, 1999.

BORÉM, E.; CAIXETA, T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Ed. UFV, 2006. 374 p.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 1, p. 209–215, 2001.

CAIXETA, E.T. et al. Tipos de marcadores moleculares *In*: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Eds.) **Marcadores Moleculares**. 2º E. Viçosa: UFV, 2009, p. 11-93.

CULLEY, T. M.; WOLFE, A. D. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens*, as indicated by isozyme and ISSR molecular markers. **Heredity**, Oxford, v. 86, p. 545–556, 2001.

DARRAULT, R.O; SCHLINDWEIN, C. Esfingídeos (Lepidoptera, Sphingidae) no Tabuleiro Paraibano, Nordeste do Brasil: Abundância, riqueza e relação com plantas esfingófilas. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 429-443, 2002.

DIAS, M. G. L.; MARANHÃO, T. O. *Análise citogenética e palinológica quanto à viabilidade e morfologia em mangabeira (Hancornia speciosa)*. **Biociências**, Porto Alegre, v. 1, p. 61- 69. 1994.

DOGAN, B., DURAN, A.; HAKKI, E. E. Phylogenetic analysis of *Jurinea* (Asteraceae) species from Turkey based on ISSR amplification. **Annals of Botany Fenici**, Oxford, v. 44, p. 353–358, 2007.

ESPÍNDOLA, A. C. de M. Prospecção, coleta e manutenção de germoplasma de mangabeira em Alagoas. *In*: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA 5, 2003, Aracaju, SE. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. Disponível em CD-ROM.

FAISAL, M.; AHMAD, N.; ANIS, M. Shoot multiplication in *Rauvolfia tetraphylla* L. using thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 80, p. 187-190, 2005.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas e conservação e uso de recursos genéticos**. Brasília: Embrapa Cerrado, 2006. 102 p.

FERREIRA, E. G. et al. **Mangaba**: diagnóstico da cadeia produtiva nos Estados da Paraíba e Rio Grande do Norte. João Pessoa: EMEPA/CNPQ, 2008. 64 p. (Documentos, 55).

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

FERREIRA, E.G.; MARINHO, S.J.O. Produção de frutos da mangabeira para consumo *in natura* e industrialização. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.1, n.1, p.9-14, set. 2007.

FERRO, R. Brasil tem 21 sabores sob risco de extinção; **Envolve Verde Revista Digital**, 2010. Disponível em: <http://www.envolverde.com.br/materia.php?cod=85398&edt=>. Acesso em: 10 Jan. 2011.

FREITAS, L. B.; BERED, F. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: UFRGS. 2003. 463p.

GANGA, R. M. D. **Variabilidade de plantas e progênies de populações naturais de *Hancornia speciosa* do Cerrado**. 2008. 122 f Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

GIACOMETTI, D. C. Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTEIRAS NATIVAS 7, 1992, Cruz das Almas, BA. **Anais...** Cruz das Almas, BA: Embrapa - CNPMF, p. 13-27, 1993.

GOMES, G. A. C. Icropropagation of *Maclura tinctoria* L.: an endangered woody species. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 1, p. 25-30, 2010.

GONZALEZ, A. et al. Assessment of inter simple sequence repeat markers to differentiate sympatric wild and domesticated populations of common bean. **Crop Science**, Washington, v. 45, n. 2, p. 606–615. 2005.

IBRAHIM, M. M. et al. Efficiency of RAPD and ISSR Markers in Assessment of Genetic Diversity in Some *Catharanthus roseus* L. Cultivars Grown in Egypt. **World Applied Science Journal**, Oxford, v. 26, n. 11, p. 1407-1415, 2013.

JOSHI, S. P. et al. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. **Theoretic and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 100, n. 8, p. 1311-1320, 2000.

LEDERMAN, I. E. et al. de M. **Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes)**. Jaboticabal: São Paulo. 2000. 35 p. (Série frutas Nativas).

LEMOS, E. E. P. de. et al. Micropropagação. In: SILVA JUNIOR, J. F. da; LEDO, A. da S. (Ed.). **A cultura da mangaba**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, p. 125-133, 2006.

LIMA, E. C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; SOARES, F. P.; EMRICH, E. B.; SILVA, A. A. N. Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* Baill. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p.17-22, jan./fev., 2008.

LORENZI, H. E. M. **Plantas medicinais no Brasil / Nativas e exóticas**. Nova Odessa. 2002. 512 p.

MANICA, I. Mangaba. In: ____. **Frutas nativas, silvestres e exóticas 2: técnicas de produção e mercado**. Feijoa, figo-da-índia, fruta-pão, jaca, lichia, mangaba. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2002. p. 459-540.

MARKERT, C.L.; MOLLER, F. Multiples forms of enzymes tissue, ontogenetic and especies specific patterns. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 45, n. 2, p. 753-762, 1959.

MERRIL, K. R., MEYER, S. E. & COLEMAN, C. E. Population Genetic Analysis of *Bromus tectorum* (Poaceae) Indicates Recent Range Expansion may be Facilitated by Specialist Genotypes. **American Journal of Botany**, St. Louis v. 99, n. 3, p. 529–537, 2012.

MICHELAN, et al. Morphological and genomic characterization of *Rhynchospora tenuis* complex (Cyperaceae) and its taxonomic implications. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 4, 2012.

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

MOURA, N.F. et al. Seleção de marcadores RAPD para o estudo da estrutura genética de populações de *Hancornia speciosa* Gomez. **Bioscience Journal**, Uberlândia , v. 21, p. 119-125, 2005.

MOURA, F. N. et al. Diversidade genética e variação fenotípica de caracteres morfológicos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). In: SIMPÓSIO NACIONAL CERRADO, 9.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS, 2., 2008, Brasília. Desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais: **Anais...** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. p. 1-7.

MOTA, D.M.; SILVA JÚNIOR, J.F.; SCHMITZ, H. Os catadores de mangaba e a conservação da biodiversidade no território Sul sergipano. In: Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural. 43, Ribeirão Preto, 2005, **Anais**, Brasília: SOBER. Pesquisa financiada com recursos do MCT/CNPq.

NASS, L. L. et al. Pré-melhoramento de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, v. 9, p. 683-716, 2008.

OLIVEIRA, L. M. Q.; VALIO, I. F. M. Effects of moisture content on germination of seeds of *Hancornia speciosa* Gom. (Apocynaceae). **Annals of Botany**, Oxford, v. 69, n. 1, p. 1-5, 1992.

OLIVEIRA, T.M.S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. 2010. 111 f. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Universidade de Aveiro, Portugal.

PEREIRA, A. V. Propagação por enxertia. In: SILVA JUNIOR J. F.; LÉDO, A. S. **A cultura da mangaba**. Embrapa Tabuleiro Costeiros, Aracaju, 2006, p. 111-124.

PINHEIRO, C. S. Germinação in vitro de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p.413-416, 2001.

PIMENTEL, M. de L.; SANTOS, E. O. dos. **Preservação do poder germinativo de sementes de mangaba *Hancornia speciosa* Gomes**. Recife: IPA, 1978. 6 p. (IPA. Comunicado Técnico).

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária**. 4. ed. Lavras: UFLA, 2008. 463 p.

RAKOCZY-TROJANOWSKA, M.; BOLIBOK, H. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 9, n. 1, p. 221-238, 2004.

REEDY, M. E.; KNAPP, A. D.; LAMKEY, K. R. Isozyme allelic frequency changes following maize (*Zea mays* L.) germplasm regeneration. **Maydica**, v. 40, n. 1, p. 269-273, 1995.

RODRIGUES, J. F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. mantiqueirae* (Fowlie) van den Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Programa de

Pó-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SCHNEIDER, A. A. **Estudo Taxonômico de Baccharis L. sect. Caloupterae DC. (Asteraceae: Astereae) no Brasil**. 2009. 197 f. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

SEMAGN, K.; BJØRNSTAD, Å.; NDJIONDJOP, M. N. An overview of molecular marker methods for plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 25, p. 2540-2568, 2006.

SILVA JUNIOR, J. F. et al. Variabilidade em populações naturais de mangabeira do litoral de Pernambuco. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, p. 373-378, 2007.

SILVA JUNIOR J. F. et al. Recursos genéticos nos tabuleiros costeiros e baixada litorânea do nordeste. In: SILVA JUNIOR J.F., LÉDO, A.S. **A cultura da mangaba**. Embrapa Tabuleiro Costeiros, Aracaju, v. 5, p. 57-74. 2006.

SILVA JUNIOR J. F. et al. **A cultura da mangaba**. Embrapa Tabuleiro Costeiros, Aracaju, v. 5, p. 25-33, 2006.

SILVA, J. A. et al. **Frutas nativas dos cerrados**. Brasília: EMBRAPA – CPAC, 166p., 1994.

SMITH, J. F.; BATEMAN, T. A. Genetic Differentiation of Rare and Common Varieties of *Eriogonum shockleyi* (Polygonaceae) in Idaho Using ISSR Variability. **Western North American Naturalist**, v. 62, n. 3, p. 316-326, 2002.

SOARES, F. P. et al. de. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA₃ e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1847-1852, 2009.

SOUSA, C. S. et al. Germinação e indução de brotações *in vitro* utilizando diferentes reguladores vegetais em mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 276-278, 2007.

TAVARES, S. Estudos sobre germinação de sementes de mangaba, *Hancornia speciosa* Gomes. **Arquivos do Instituto de Pesquisas Agronômicas**, Recife, v. 5, p. 193-199, 1960.

TSUMURA, Y. et al. Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Southeast Asia using RFLP of PCR-amplified chloroplast genes. **theor appl genetics**.

Berlim, v. 93, n. 2, p. 22-29. 1996.

VIEIRA, G. **Fisiologia pós-colheita do amadurecimento do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener)**. 1997. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

VIEIRA NETO, R.D. **Recomendações técnicas para o cultivo da mangabeira**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. 26 p. (Circular Técnica, 20).

VILLACHICA, H.; CARVALHO, J. E. U. de; MÜLLER, C. H.; DIAZ S., C.; ALMANZA, M. Mangaba. In:__. **Frutales y hortalizas promisorios de la amazonia**. Lima: Tratado de Cooperacion Amazonica,.v.100, n. 1, p.191-194. 1996.

WOLFE, A. D.; XIANG, Q. KEPHART, S. R. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. **Molecular Ecology Resources**, v. 7, n. 2, p. 1107-1125. 1998.

YANG, W. P. et al. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. **Crop Science**, Washington, v. 36, n. 1, p. 1669-1676, 1996.

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

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. V.; PINHEIRO, J. B.; BRONDANI, C.; VENCOVSKY, R. Transferability of microsatellites markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Notes**, , v. 2, n. 4, p. 512-514, 2002.

CAPÍTULO II – Diversidade genética de populações naturais de mangabeira em Pernambuco por meio de marcadores moleculares

Trabalho a ser enviado para a **Revista Caatinga**

DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE MANGABEIRA EM PERNAMBUCO, BRASIL, POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES¹

HORACE JOSÉ JIMENEZ^{2*}, LUIZA SUELY SEMEN MARTINS³, ANGÉLICA VIRGÍNIA VALOIS MONTARROYOS⁴, RÔMULO MACIEL MORAES FILHO⁵, JOSUÉ FRANCISCO DA SILVA JUNIOR⁶, ANA LILIA ALZATE⁷

RESUMO: O objetivo do presente trabalho foi avaliar a diversidade genética de 38 indivíduos de mangabeiras de três populações naturais do Estado de Pernambuco por meio da técnica de marcadores moleculares ISSR. A primeira população abrangeu treze indivíduos localizados nas regiões de Tamandaré e Carneiro, a segunda população abrangeu doze indivíduos de ocorrência na Ilha de Itamaracá e a terceira foram coletados treze indivíduos nas regiões de Nazaré e Praia do Paiva. Com os dados foram realizados análises de coordenadas principais, estrutura de populações e gerado dendrograma relacionando todas as três populações através do método UPGMA. Também foram calculados percentual de locos polimórficos, diversidade genética de Nei, parâmetros de heterozigosidade total, a heterozigosidade média dentro de grupos, coeficiente médio de diferenciação entre os grupos e número de migrantes por geração. Com os *primers* ISSR selecionados foram identificados um total de 93 locos, sendo dez monomórficos e 83 polimórficos. A média de bandas polimórficas por *primer* foi de 11,5, onde o *primer* UBC#851 foi o mais polimórfico, apresentando 14 bandas. Ao cruzar as informações obtidas entre o agrupamento UPGMA, ACoP e a estrutura das populações, os indivíduos *Hancornia* 56, *Hancornia* 57 e *Hancornia* 58 evidenciaram uma estreita relação entre eles. Os resultados mostraram um alto nível de diversidade genética ($H_e = 0,30$), sendo verificado que a maior parte da variabilidade genética se encontra dentro das populações. O fluxo gênico estimado foi de 1,18, ratificando a informação de que as espécies arbóreas tropicais têm apresentado valores de número de migrantes superiores a 1.

Palavras-chave: Recursos genéticos; mangaba; Apocynaceae; ISSR.

*Autor para correspondência.

¹Recebido para publicação em; aceito em

Trabalho extraído da Dissertação de Mestrado do primeiro autor.

²Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/ Melhoramento Genético de Plantas – UFRPE, horacejimenez@yahoo.com.br

³Professora Associada do Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros s/n, Bairro: Dois Irmãos, CEP:52171-900, Recife-PE. luiza@db.ufrpe.br

⁴Professora Adjunta do Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Pernambuco, angelicavalois@gmail.com

⁵Doutorando do Departamento de Genética da USP/FMRP. romulommfilho@yahoo.com.br

⁶Pesquisador da EMBRAPA. josue@uep.cnps.embrapa.br

⁷Professora do Departamento de Genética da USP/FMRP. anaalzatem@yahoo.com.br

GENETIC DIVERSITY OF NATURAL POPULATIONS MANGABEIRA IN PERNAMBUCO, BRAZIL, THROUGH MOLECULAR MARKERS

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the genetic diversity of 38 individuals from three *H. speciosa* populations in Pernambuco State, Brazil, using ISSR molecular markers. The first population comprised thirteen individuals located in the regions of Tamandaré and Carneiros, the second population comprised twelve individuals occurring on Itamaraca region and third thirteen individuals were collected in regions of Nazareth and Paiva . With obtained data, we performed population structure analysis, Principal Coordinate Analysis, and a UPGMA dendrogram with all genotypes. Number of polymorphic loci number of monomorphic loci, Nei's genetic diversity, total heterozygosity , mean heterozygosity within groups , mean coefficient of differentiation between groups and number of migrants per generation were also calculated. With the selected ISSR primers we observed a total of 93 loci, ten were monomorphic and 83 showed polymorphism. The average number of polymorphic bands per primer was 11.5 , where the primer UBC # 851 was the most polymorphic, with 14 bands . By cross checking between the UPGMA clustering , PCoA and structure of population, Hancornia 56 , 57 and Hancornia Hancornia 58 subjects showed a close relationship between them . The results showed a high level of genetic diversity within species ($H_e = 0.30$), and found that most of the genetic variability found within a population . The gene flow was 1.18 , confirming information that tropical tree species have shown values of N_m greater than 1 .

Keywords: genetic resources; mangaba; Apocynaceae; ISSR.

INTRODUÇÃO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), frutífera tropical nativa do Brasil, cresce e se desenvolve na ampla vegetação do bioma do Cerrado, principalmente nas regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste e na região dos Tabuleiros Costeiros e da Baixada Litorânea (VIEIRA NETO et al., 2009). Está presente desde o Estado do Amapá até o Estado de São Paulo. Entretanto, é no litoral da Região Nordeste que sua exploração tem sido mais intensificada (LEDERMAN et al., 2000; SILVA JÚNIOR ; LÉDO, 2006).

Atualmente a mangabeira vem apresentando seu germoplasma bastante ameaçado, devido a redução da sua área original de ocorrência pelo desmatamento, especulação imobiliária e plantio de cultivos como cana-de-açúcar, coqueiro e pastagens. Assim sendo, a referida espécie é uma das fruteiras mais ameaçadas de extinção (no nordeste brasileiro LEDERMAN et al., 2000). Acredita-se que a mangabeira venha sofrendo significativa erosão genética e supõe-se que grande parte do germoplasma de interesse já tenha sido perdido sem que, ao menos, fosse registrada a sua ocorrência (AGUIAR FILHO et al., 1999; LEDERMAN et al., 2000; VIEIRA NETO, 2002; SILVA JÚNIOR ; LÉDO, 2006).

Estudos sobre a variabilidade genéticas das populações existentes de mangabeiras na região do nordeste brasileira são escassas. Segundo Kanashiro (1992), todo trabalho que fundamenta-se em estudos de populações, considerando-se melhoramento genético, a caracterização da variabilidade genética é muito importante. No processo de amostragem das populações, o conhecimento da estrutura genética é um importante fator a ser considerado, uma vez que este pode afetar diretamente a viabilidade das populações a longo prazo. Esse quadro tem refletido a necessidade de se identificar, coletar, conservar e caracterizar os recursos genéticos da mangabeira disponíveis nas áreas de ocorrência, ou de cultivo, o mais rápido possível. Esses trabalhos são essenciais aos programas de melhoramento, que poderão resultar na identificação de genótipos superiores adaptados aos diferentes ecossistemas, com resistência e/ou tolerância às principais doenças e pragas e na seleção de variedades com características agronômicas e tecnológicas de interesse para a exploração comercial (SILVA JÚNIOR ; LÉDO, 2006).

Marcadores moleculares têm sido utilizados como ferramenta para estudo de genética de populações, principalmente por obter informações sobre a variabilidade genética do DNA. Para análise da diversidade genética, dados como o polimorfismo, heterozigosidade média e a diversidade alélica são geralmente identificados por marcadores microssatélites (WUNSCH ; HORMAZA, 2007). Marcadores dominantes, como o ISSR, também se apresentam úteis em estudos de diversidade genética entre populações (ZIMMER et al., 2005).

São poucos os trabalhos publicados com marcadores moleculares para estudo de genética de populações em mangabeiras. Costa (2011) estimou a variabilidade genética de 55 acessos de *Hancornia* de um BAG no Estado de Sergipe, com marcadores RAPD,

constatando baixa diversidade genética entre os materiais. Silva (2012) estudou a diversidade genética em 20 genótipos de *Hancornia* e obteve consideráveis valores de similaridade, baseados em dados de RAPD. Martins et al. (2012), trabalhando com 164 indivíduos de *H. speciosa*, utilizando 11 locos enzimáticos, avaliaram a diversidade e estrutura genética das populações naturais de mangabeiras, demonstrando o potencial dos mesmos para conservação *in situ*.

O presente trabalho teve como objetivo a análise de três populações de mangabeiras de ocorrência no Estado de Pernambuco com a finalidade de se conhecer a diversidade genética dentro e entre as populações naturais, utilizando marcadores ISSR.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal – Área de Fitotecnia, do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco e no Laboratório de Genética Vegetal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. As amostras foram coletadas de três populações naturais da Zona da Mata, no Estado de Pernambuco – Brasil, totalizando 38 indivíduos. A primeira população abrangeu treze indivíduos localizados nas regiões de Tamandaré e Carneiro, a segunda abrangeu doze indivíduos de ocorrência na lha de Itamaracá e a terceira com treze indivíduos das regiões de Nazaré e Paiva (Figura 1 e Tabela 1).



Figura 1. Indicações dos locais de coleta dos indivíduos de mangabeiras (*Hancornia speciosa* Gomes) no Estado de Pernambuco, Brasil.

Tabela 1. Indivíduos analisados de três populações naturais de mangabeiras (*Hancornia speciosa* Gomes) da zona da mata de Pernambuco, Brasil. UFRPE, 2013

POPULAÇÕES	LOCALIZAÇÃO	INDIVÍDUOS	LONGITUDE/ LATITUDE
1	Tamandaré	Han 1, Han 2, Han 3, Han 4, Han 5, Han 12, Han 13, Han 16, Han 17, Han 18, Han 19 e Han 20	35° 5' 53" W / 8° 44' 27" S
2	Carneiros	Han 9	35° 5' 44" W / 8° 42' 31" S
3	Ilha de Itamaracá	Han 21, Han 22, Han 24, Han 26, Han 28, Han 30, Han 31, Han 32, Han 35, Han 36, Han 37, Han 38	34° 51' 0" W / 7° 48' 42" S
4	Nazaré	Han 42, Han 43, Han 46, Han 47, Han 50, Han 54, Han 55, Han 56, Han 57, Han 58, Han 59, Han 60	34° 57' 19" W / 8° 20' 37" S
5	Praia do Paiva	Han 48	34° 57' 22.77" W / 8° 16' 30.83" S

Han = *Hancornia*

O DNA foi extraído de cerca de um grama de folha macerada em nitrogênio líquido, segundo a metodologia de Murray & Thompson (1980), onde ao material macerado foi adicionado 600 µL de tampão de extração (CTAB, 2%; NaCl, 1,4M; EDTA, 0,02M; Tris-HCl, 0,1M, pH 8,0; β-mercaptoetanol, 1%). Os tubos de eppendorf foram agitados por 30 segundos e incubados a 65°C por 30 minutos. Então, 600µL de Clorofórmio- Álcool Isoamílico foram adicionados aos tubos e estes foram agitados por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas a 7000 rpm, em 4°C por 5 minutos, e o sobrenadante foi transferido para novos tubos. A estes foi adicionado 600µL de isopropanol gelado. As amostras então foram centrifugadas novamente por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. O DNA foi então precipitado pela adição de 0,1 volume de acetato de sódio a 3M e um volume de etanol gelado. Em seguida as amostras foram incubadas a 20°C por uma hora e novamente centrifugadas por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas em 300µL de etanol 70% gelado e novamente centrifugadas por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os pellets foram ressuscitados em 200µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7) adicionado de RNase e incubados a 37°C por 1h. A quantificação do DNA foi feita visivelmente em gel de agarose a 0,8% e as concentrações padronizadas em 15 ng/µL.

Um conjunto de 6 primers foram utilizados e as reações de amplificação foram feitas em um volume final de 25µL contendo: 10mM Tris-HCL, pH 8.0, 50mM KCl, 2mM de MgCl₂, 100mM dNTP, 1 unidade de Taq DNA polimerase, 25 ng de DNA e

0,4mM do primer. As ampliações, realizadas em termociclador Mastercycler Eppendorf, foram feitas seguindo as programações: desnaturação inicial a 95° por 15 minutos, seguidos de 30 a 35 ciclos de desnaturação a 94° por 30 segundos, temperatura de anelamento específica de cada primer por 45 segundos e extensão a 72° por 2 minutos, e extensão final a 72° por 7 minutos ao fim dos ciclos de amplificação (Tabela 2).

Tabela 2. Sequências dos *primers* ISSR utilizados no estudo de diversidade de 38 indivíduos de mangabeiras (*Hancornia speciosa* Gomes) do Estado de Pernambuco, Brasil. UFRPE, 2013

PRIMER	SEQUENCIA	TA°C	N°CICLOS
#1	ACACACACACACACT	50	35
#2	GAGAGAGAGAGAGAT	50	35
#834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	50	35
#851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG	50	35
#860	TGT GTG TGT GTG TGT GRA	50	35
#866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC	50	35

R= (A,G), Y = (C,T); TA= temperatura de anelamento

Para avaliação da qualidade da amplificação, preparou-se um gel de poli-acrilamida a 8% não desnaturante (1,4mL de glicerol; 11,06mL de H₂O destilada; 5,33mL de solução de acrilamida/bis-acrilamida (29:1) e 2,0mL de TBE 10X). O TEMED e persulfato de potássio (650mg de persulfato de potássio e 6,5mL de H₂O), foram adicionados a mistura do gel (15,0μL de TEMED e 300,0 μL de persulfato de potássio), produzindo 20mL de solução. Foi preparado um sistema de cassete composto de duas placas de vidro com dimensões 12,0cm x 16,5cm que foram separadas por espaçadores de teflon e presas com grampos. Após a inserção do gel no sistema de cassete, colocou-se um pente de teflon na borda superior para formação dos poços no gel.

Após cerca de 20 minutos (fim da polimerização), os géis foram montados em uma cuba eletroforese vertical contendo tampão TBE 1X em ambos os polos (porção superior e inferior), conectada a uma fonte Amersham Pharmacia Biotech (EPS 1001).

Para aplicação nos géis, foram colocados 5μL do produto da PCR e 10μL de tampão de carregamento (900μL de bromofenol; 900μL xilenocianol; 900μL de TBE 10X; 4,5mL de Ficol 30% diluído em água destilada), 1,8mL de EDTA 0,5M pH 8,0 e 3,6g de sacarose sem formamida.

Após o termino da corrida, os géis foram corados com nitrato de prata de acordo com o protocolo adaptado de Sanguinetti et al. (1994), e realizada a etapa da fixação, em que o gel foi colocado em um recipiente de vidro contendo 200mL de solução fixadora (160mL de etanol; 7mL de ácido acético glacial e 833mL de água destilada)

Na fase da revelação, 200mL de solução reveladora (22g de NaOH dissolvidos em 1L de água destilada) foram despejados cuidadosamente no recipiente contendo o

gel, juntamente com 1,5mL de formaldeído, sendo submetido a agitação por alguns minutos até que as bandas aparecessem nitidamente. A solução reveladora foi pré aquecida em estufa para facilitar a reação de revelação. Por fim, a solução reveladora foi descartada e a reação bloqueada com a lavagem direta do gel em 200mL de solução fixadora

O polimorfismo obtido pela técnica de ISSR foram tabulados como a presença ou ausência de bandas. O programa NTSYSpc (ROHLF, 2000) foi utilizado para construir uma matriz de distância genética (NEI,1978) e a partir daí, um dendrograma foi obtido relacionando todas as populações através do método UPGMA (Unweighted pair group Method With Arithmetic Average). As Análises de Coordenadas Principais (ACoP) foram feitas utilizando o pacote estatístico XLSTAT (ADDINSOFT, 2009).

Loci polimórficos (LP), loci monomórficos (LM), diversidade genética de Nei (He), parâmetros de heterozigosidade total (Ht), a heterozigosidade média dentro de grupos (Hs), coeficiente médio de diferenciação entre os grupos (GST), (parâmetros de heterozigosidade total de acordo com Nei (1978)) e número de migrantes por geração (Nm) foram obtidos utilizando o software POPGEN32 (YEH et al., 1999).

Duas estratégias foram realizadas para quantificar a estrutura de populações entre e dentro dos grupos genéticos analisados. A primeira foi uma Análise de Variância Molecular (AMOVA) utilizando o programa Arlequin. A segunda estratégia foi estimar a estruturação genética com base na informação individual dos genótipos para cada loco a partir do programa STRUCTURE (PRICHARD et al., 2000). Foram estimadas as probabilidades para valores de K, que tem a função de testar a regularidade dos resultados, onde variou de um até sete. Para testar a regularidade dos resultados, cada valor de K foi estimado duas vezes independentemente a partir de 100.000 interações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conjunto de primers de ISSR utilizados geraram 93 locos, obtendo-se média de 11,5 locos por primers, variando de 9 - UBC#866 a 14 - UBC#851 (Figura 2). Do total de locos observados, 10 (10,8%) foram monomórficos e 83 (89,255%) mostraram-se polimórficos, revelando assim alta variabilidade genética dos indivíduos. Costa et al. (2011), trabalhando com 13 primers de RAPD em mangabeiras, obtiveram uma media de seis fragmentos por primers, num total de 82 loci.

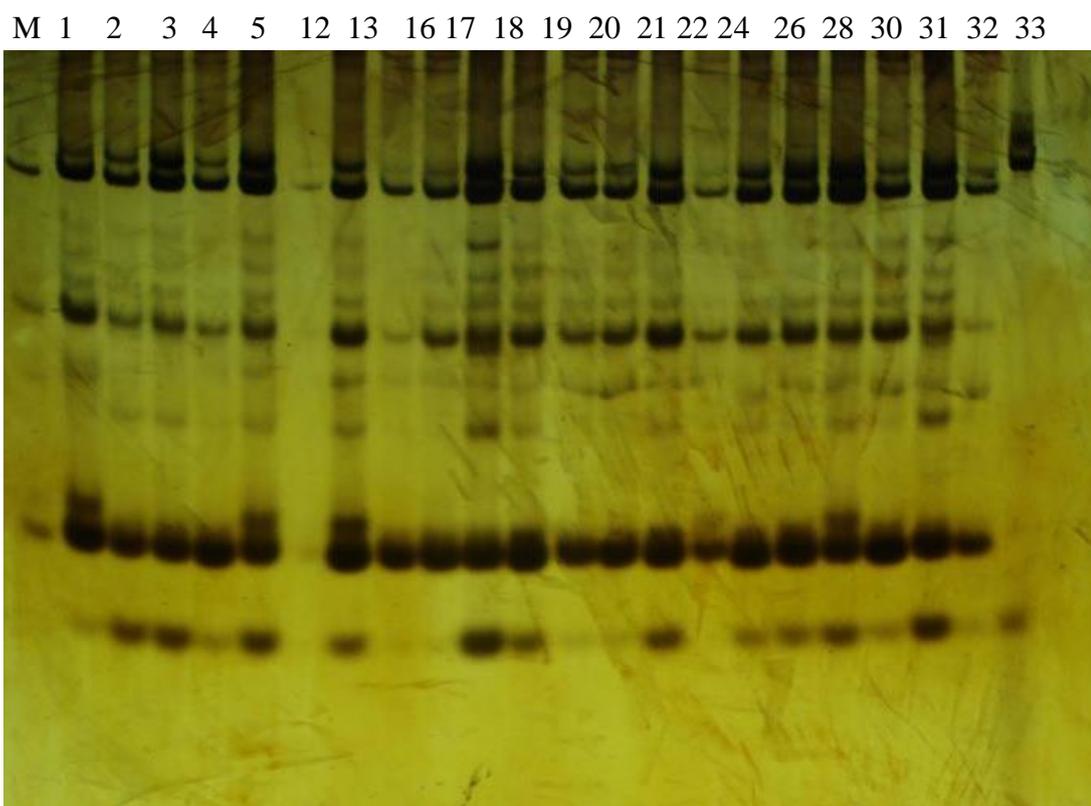


Figura 2. Padrão de bandas PCR – ISSR para os indivíduos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) utilizando-se o primer UBC #851.

De acordo com a análise do dendrograma (Figura 3) e da matriz de similaridade genética foi possível a formação de dois grandes grupos. Um formado pela *Hancornia* 2 e *Hancornia* 3 provenientes da população 1 e o outro grupo formado pelos demais 36 indivíduos que se subdivide em vários subgrupos. A maior distância foi observada entre *Hancornia* 32 e *Hancornia* 46 da população 2 (51%) e a menor entre *Hancornia* 18 e *Hancornia* 20 ambos da população 1 (4%).

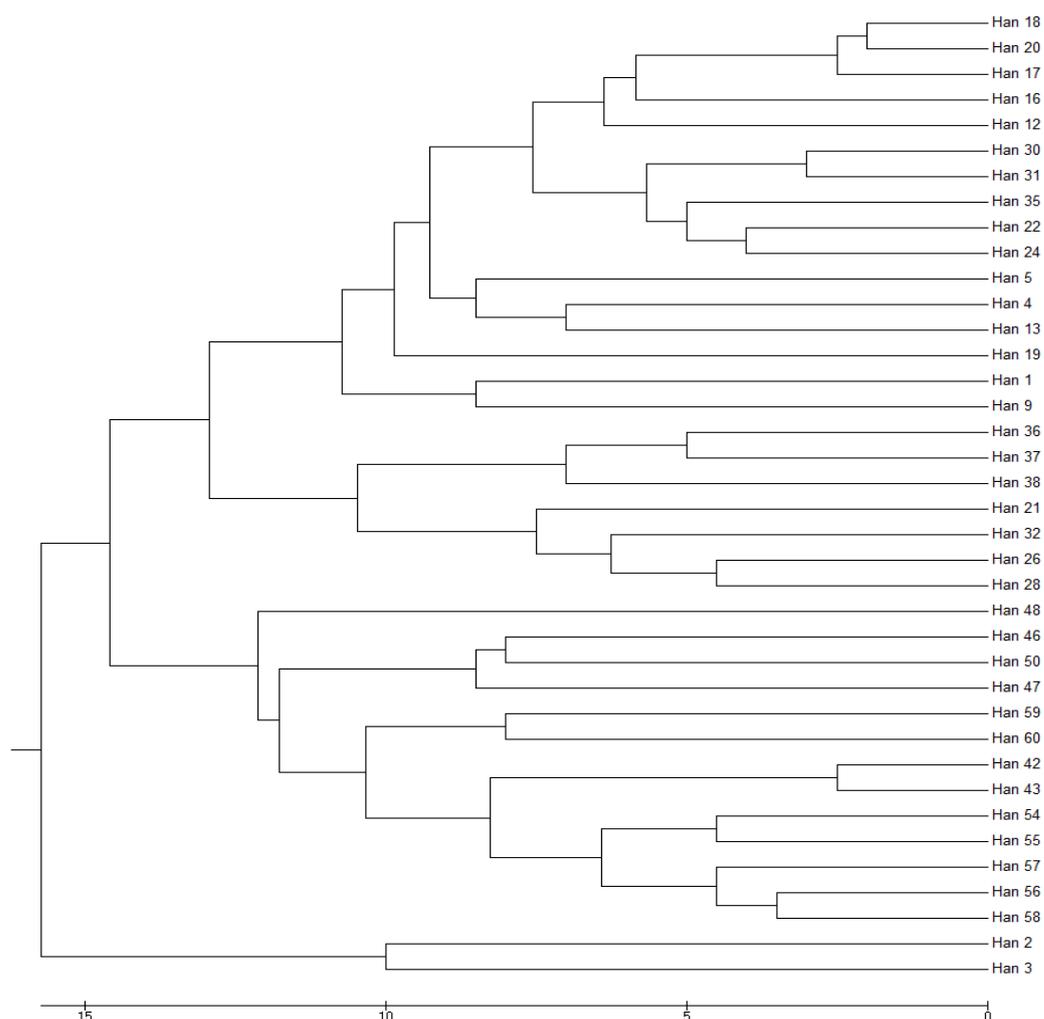


Figura 3. Análise de agrupamento de 38 indivíduos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), obtida por meio do programa NTSYSpc, usando a UPGMA. (Han= *Hancornia*).

O \hat{H}_e foi alto em todas as populações (Tabela 3), onde a população da Região 3 apresentou maior \hat{H}_e (22,97%), seguido da população da Região 1 (20,75%) e população da Região 2 (19,69%), o que demonstra razoável variabilidade genética comparada com a total ($H_t = 30,8\%$). A partir do valor observado para a diversidade genética entre populações ($G_{ST}=0,29$) pode-se inferir que a variabilidade amostrada, contribui com 29% para a heterozigosidade total, sendo 71% da variabilidade genética distribuída dentro das populações.

Identidade genética de Nei (1978) entre populações mostrou maior similaridade entre as populações das Regiões 1 e 3 (0,8599) e a menor entre as populações das Regiões 1 e 2 (0,8513). A similaridade intermediária foi entre as populações das Regiões 2 e 3 (0,7780) (Tabela 4).

Tabela 3. Variáveis usadas no estudo das populações de *Hancornia speciosa*, de três regiões da Zona da Mata do Estado de Pernambuco. NL: Número de loci, LP: Loci polimórficos, LM: Loci monomórficos, \hat{H}_e : Diversidade genética de Nei (1978), Ht: Diversidade genética total, Hs: Diversidade média intrapopulacional. Gst: Coeficiente de Diferenciação, Nm: Numero de migrantes por geração

	NL	LP	LM	\hat{H}_e	Ht	Hs	Gst	Nm
UBC#1	15	14	1	-	-	-	-	-
UBC#2	17	14	3	-	-	-	-	-
UBC#834	21	17	4	-	-	-	-	-
UBC#851	16	16	0	-	-	-	-	-
UBC#860	15	14	1	-	-	-	-	-
UBC#866	9	8	1	-	-	-	-	-
Região 1	93	55 (59,14%)	38	20,75%	19,95%	-	-	-
Região 2	93	51 (54,84%)	42	19,69%	18,89%	-	-	--
Região 3	93	58 (62,37%)	35	22,97%	22,17%	-	-	-
Total	93	83 (89,25%)	10	30,8%	30%	21,13%	29,76%	1,18

Tabela 4. Identidade genética de Nei (1978) e distância genética em três populações de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) no Estado de Pernambuco, Brasil. UFRPE, 2013

Pop	1	2	3
1	-	0,8513	0,8599
2	0,1610	-	0,7780
3	0,1509	0,2510	-

Através dos resultados obtidos com a revelação das bandas geradas pelos marcadores ISSR, constatou-se considerável polimorfismo, revelando assim ser eficiente no estudo em questão. Os maiores valores foram observados nos indivíduos da população 3 (62,37%), seguido da população 1 (59,14%) e população 2 (54,84%) (Tabela 3). Considerando todas as adesões, a percentagem de loci polimórficos foi 89,25%, indicando alta variabilidade genética das regiões coletadas de mangabeiras no litoral do Estado de Pernambuco. Costa et al. (2011) trabalhando com marcadores RAPD, obtiveram 95% de loci polimórficos em 55 acessos de mangabeiras do Estado da Paraíba, sendo um valor próximo ao obtido no presente estudo. Silva et al. (2012),

também trabalhando com marcador RAPD em mangabeiras, constataram 85% de polimorfismo em 20 acessos localizadas em Sergipe.

Os valores de H_e no presente estudo foram semelhantes aos estudos realizados com populações naturais de mangabeiras, onde Costa et al. (2011) obtiveram valores de 0,11 a 0,26 e Martins et al. (2012) observaram valores de 0,30 a 0,42. Em condições naturais, espera-se que a H_e seja sempre diferente de zero, pois há a possibilidade de os genótipos incorporarem novos alelos por meio de cruzamentos ou de ocorrer perdas em populações pequenas ou fragmentadas por deriva genética (BARREIRA et al., 2006).

O Número Total de Alelos (N_a) foi de 1,89, enquanto Número de Alelos Efetivos (N_e), também considerado uma medida de estimativa da diversidade genética, foi 1,50. Os valores encontrados de número de alelos (N_a) para a mangaba foram superiores quando comparados aos trabalhos de Costa (2010), que estudando a variabilidade genética de *H. speciosa*, encontraram N_a de 1,15 e N_e 1,29. São poucos os trabalhos encontrados na literatura sobre este tipo estudo.

Observou-se um valor total de número de migrantes (N_m) de 1,18 (Tabela 3). Wright (1951), baseando-se numa curva de distribuição de frequências gênicas entre grupos de uma população, demonstra que se N_m é igual a 1 por geração, não haverá diferenciação genética significativa entre populações, ou seja, os efeitos da migração são suficientes para contrapor os efeitos da deriva. As espécies arbóreas tropicais têm apresentado valores de N_m superiores a 1, das quais citamos *Euterpe edulis*, com N_m igual a 10,7 (REIS, 1996), *Genipa americana* igual a 41,4 (SEBBENN, 1997) e *Xylopia emarginata* igual a 13,8 (JAEGGER, 2004).

Para a ACoP, foram identificados sete grupos entre as diferentes localidades das populações (Figura 4). O primeiro grupo (I) foi composto por nove indivíduos (*Hancornia* 1, *Hancornia* 50, *Hancornia* 54, *Hancornia* 55, *Hancornia* 56, *Hancornia* 57, *Hancornia* 58, *Hancornia* 59, *Hancornia* 60). O segundo (II) por dois (*Hancornia* 46 e *Hancornia* 47). O terceiro (III) por seis (*Hancornia* 26, *Hancornia* 32, *Hancornia* 28, *Hancornia* 38, *Hancornia* 21 e *Hancornia* 37). O quarto (IV) por *Hancornia* 36. O quinto (V) por quatorze indivíduos (*Hancornia* 5, *Hancornia* 9, *Hancornia* 12, *Hancornia* 13, *Hancornia* 16, *Hancornia* 17, *Hancornia* 18, *Hancornia* 19, *Hancornia* 20, *Hancornia* 22, *Hancornia* 24, *Hancornia* 30, *Hancornia* 31, *Hancornia* 35). O sexto (VI) por três- (*Hancornia* 2, *Hancornia* 3 e *Hancornia* 4) e o sétimo (VII) por três indivíduos (*Hancornia* 42, *Hancornia* 43 e *Hancornia* 48). Essa divisão em quadrantes diferentes indica uma grande diversidade genética para estes indivíduos.

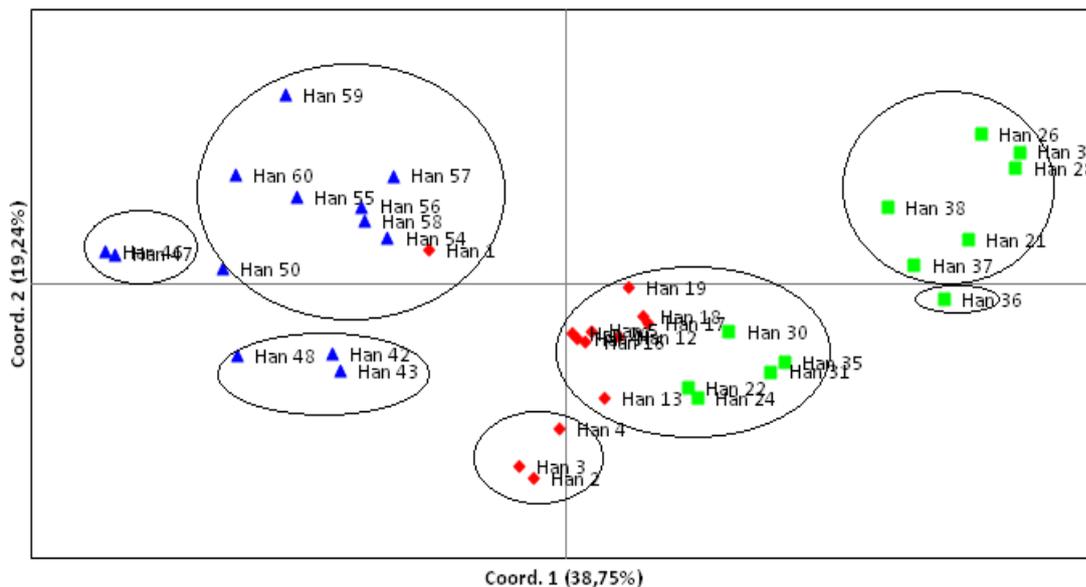


Figura 4. Análise de coordenadas principais (ACoP) para as diferentes localidades de indivíduos de mangabeiras (*Hancornia speciosa* Gomes) do Estado de Pernambuco. ◊.(vermelho): população 1, ◻ (verde): população 2 e Δ (azul): População 3.

Ao relacionar as informações entre o agrupamento UPGMA e a ACoP, observou-se que os grupos V da análise de coordenadas, agrupou indivíduos *Hancornia* 12, *Hancornia* 16, *Hancornia* 17, *Hancornia* 18 e *Hancornia* 20 do agrupamento UPGMA, indicando assim pouca divergência entre eles. Há também um grande número de indivíduos agrupados no grupo I da ACoP, sendo similar ao maior número de indivíduos reunidos no dendrograma (*Hancornia* 54, *Hancornia* 55, *Hancornia* 56, *Hancornia* 57 e *Hancornia* 58). Observou-se a formação de um grupo isolado (VI) dos indivíduos *Hancornia* 2 e *Hancornia* 3 da população 1 tanto na análise de coordenadas principais (ACoP) como no agrupamento UPGMA.

Os indivíduos *Hancornia* 5 e *Hancornia* 9 se agruparam em posições diferentes no dendrograma; contudo, na ACoP estão relacionados. O mesmo ocorreu entre os indivíduos *Hancornia* 16 e *Hancornia* 20, *Hancornia* 42 e *Hancornia* 48 e *Hancornia* 31 e *Hancornia* 35.

Os índices de fixação da AMOVA, que medem a proporção de variação genética dentro das três populações (Φ_{st}) analisadas foi de 70%. Já o índice que mede a proporção entre as regiões (Φ_{ct}) apresentou 30% (Tabela 5). Esses resultados de Φ_{ct} indicam que estão de acordo com o observado para o valor de G_{st} .

Tabela 5. Análise de variância molecular dos 38 indivíduos de mangabeiras (*Hancornia speciosa* Gomes) localizadas no Estado de Pernambuco, Brasil. UFRPE, 2013

	GI	Soma dos Quadrados	Variância Estimada.	%
Entre Regiões, Φ_{st}	2	125,496	4,178	30%
Dentro das Regiões, Φ_{ct}	35	345,109	9,860	70%
Total	37	470,605	14,039	100%

Os resultados obtidos pelo programa STRUCTURE, mostraram a distribuição e influência de cada grupo genético dentro das populações inferidas. Diante das possibilidades testadas, o valor de K mostrou ser o mais adequado para explicar o conjunto de dados fornecidos, sendo igual a sete (ΔK) (Figura 5).

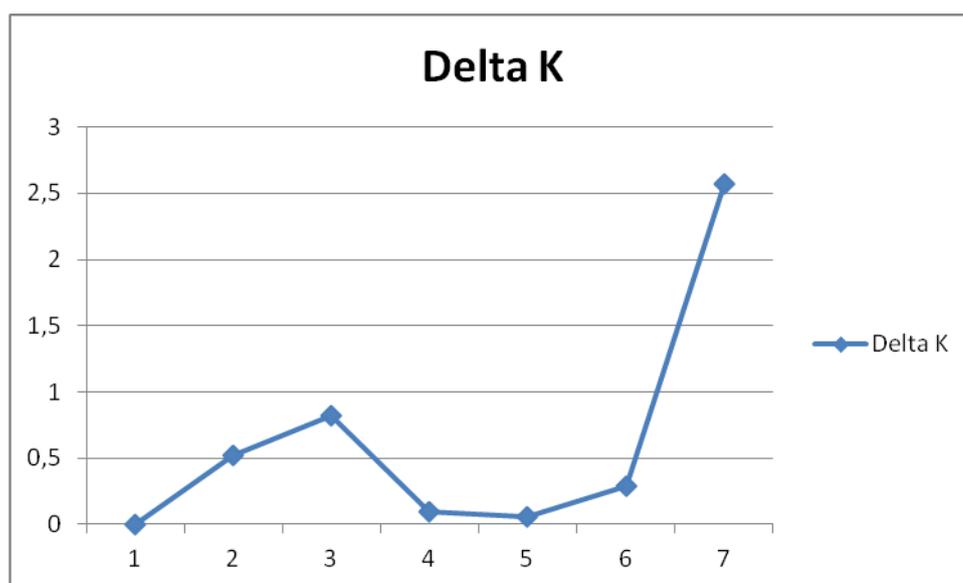


Figura 5. Valores de ΔK para cada valor de K, calculado para os 38 indivíduos de populações naturais de mangabeiras do Estado de Pernambuco. O maior valor de ΔK corresponde ao K ótimo.

A atribuição de cores dada a cada indivíduo significa a proporção de ancestralidade (Q_L – *Proportion of Ancestry in Each Cluster*) do genótipo, bem como a classificação destes em uma determinada população reconstruída. Indivíduos com cores até 1,00 representam 100% de probabilidade de pertencer a uma determinada população (Figura 6).

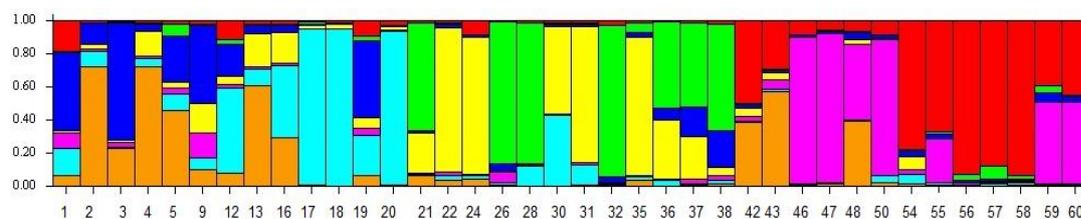


Figura 6. Relação de ancestralidade para os indivíduos de mangabeira das regiões analisadas, considerando-se a existência de sete clusters genéticos ($K=7$). População 1 (Indivíduo 1 – 20), população 2 (Indivíduo 21 – 38) e população 3 (Indivíduo 42 – 60).

Com base neste valor de K escolhido, a Tabela 6 mostra as probabilidades de certificação dos 38 indivíduos amostrados revelarem ancestralidade.

Tabela 6. Proporção de ancestralidade de cada um dos sete clusters genéticos pré-estabelecidos ($K=7$) em cada uma dos indivíduos analisados.

Indivíduo	Clusters						
	1	2	3	4	5	6	7
Han 1	0.182	0.006	0.474	0.010	0.097	0.165	0.067
Han 2	0.009	0.005	0.122	0.031	0.014	0.093	0.726
Han 3	0.004	0.004	0.712	0.010	0.028	0.009	0.233
Han 4	0.011	0.006	0.047	0.146	0.018	0.047	0.723
Han 5	0.021	0.068	0.277	0.039	0.031	0.104	0.460
Han 9	0.015	0.010	0.472	0.176	0.152	0.072	0.104
Han 12	0.113	0.024	0.196	0.047	0.024	0.515	0.080
Han 13	0.016	0.011	0.048	0.197	0.018	0.098	0.612
Han 16	0.021	0.006	0.043	0.183	0.018	0.434	0.295
Han 17	0.007	0.009	0.008	0.019	0.005	0.942	0.011
Han 18	0.008	0.005	0.006	0.024	0.004	0.947	0.006
Han 19	0.087	0.031	0.464	0.067	0.043	0.240	0.069
Han 20	0.022	0.004	0.009	0.018	0.009	0.924	0.014
Han 21	0.008	0.651	0.016	0.246	0.007	0.007	0.065
Han 22	0.014	0.006	0.018	0.872	0.025	0.026	0.041
Han 24	0.079	0.006	0.015	0.822	0.007	0.025	0.046
Han 26	0.005	0.857	0.043	0.005	0.068	0.012	0.011
Han 28	0.009	0.850	0.006	0.006	0.004	0.122	0.004
Han 30	0.009	0.008	0.015	0.527	0.008	0.426	0.006
Han 31	0.011	0.008	0.014	0.824	0.008	0.122	0.012
Han 32	0.022	0.916	0.036	0.011	0.004	0.006	0.005
Han 35	0.009	0.059	0.029	0.834	0.007	0.023	0.039

Han 36	0.004	0.520	0.074	0.359	0.004	0.032	0.007
Han 37	0.013	0.505	0.175	0.259	0.027	0.007	0.016
Han 38	0.016	0.642	0.221	0.054	0.030	0.017	0.020
Han 42	0.499	0.003	0.021	0.052	0.029	0.009	0.387
Han 43	0.291	0.003	0.021	0.046	0.059	0.012	0.573
Han 46	0.080	0.003	0.011	0.005	0.881	0.007	0.013
Han 47	0.056	0.005	0.011	0.004	0.898	0.005	0.020
Han 48	0.062	0.004	0.048	0.027	0.454	0.005	0.399
Han 50	0.079	0.004	0.018	0.009	0.825	0.040	0.026
Han 54	0.776	0.006	0.037	0.074	0.030	0.058	0.018
Han 55	0.671	0.009	0.029	0.005	0.262	0.010	0.015
Han 56	0.922	0.038	0.012	0.005	0.009	0.007	0.007
Han 57	0.876	0.076	0.016	0.004	0.012	0.009	0.007
Han 58	0.929	0.023	0.010	0.008	0.006	0.015	0.009
Han 59	0.392	0.037	0.057	0.005	0.493	0.007	0.010
Han 60	0.445	0.005	0.037	0.005	0.488	0.006	0.013

De acordo com a Tabela 6, o primeiro e sexto cluster inferidos estão diretamente relacionados, aos indivíduos *Hancornia* 18 e *Hancornia* 58, respectivamente. Os valores observados (0,929 e 0,947) comprovam a alta proporção das mesmas, refletindo uma maior identidade genética. Entretanto, apresentam-se influenciados por alelos da população 2 (cor verde e amarela na Figura 6).

O cluster 2, que apresentou uma probabilidade de certificação de 0,916 para o genótipo *Hancornia* 32, mostrou-se influenciado por alelos da população 1 e 3 (cor azul marinho e vermelho na Figura 6). Em relação ao cluster 3 e 7, apresentou 0,712 e 0,726 para *Hancornia* 3 e *Hancornia* 2, respectivamente, com presença de alelos da população 2 e 3 na sua constituição.

Os 13 indivíduos da população 1, mostraram-se mais influenciados por alelos da população 2 e 3. Este grupo apresentou as sete cores diferentes (verde, vermelho, azul marinho, azul claro, amarelo, rosa e marrom na Figura 6), destacando-se *Hancornia* 1, *Hancornia* 5, *Hancornia* 9, *Hancornia* 12 e *Hancornia* 19. Os 13 indivíduos da população 3 mostraram-se menos influenciados pelas populações 1 e 2, pois foi apresentado a presença de apenas cinco cores diferentes na sua identidade genética (marrom, rosa, vermelha, amarela e verde na Figura 6). Os indivíduos *Hancornia* 46, *Hancornia* 47, *Hancornia* 56, *Hancornia* 57 e *Hancornia* 58 apresentaram com menos cores na sua constituição. Já em relação ao grupo 2, foi indicado a presença de 6 cores no estudos dos seus indivíduos.

Os indivíduos *Hancornia* 56, *Hancornia* 57 e *Hancornia* 58 revelaram uma alta identidade genética com os valores 0,922, 0,876 e 0,929 respectivamente, onde foi observada a presença de alelos em comum entre estes indivíduos, com a presença das mesmas cores vermelho e verde entre eles (Figura 6). Ao cruzar as informações entre o

agrupamento UPGMA, ACoP e a estrutura de população, todos eles evidenciaram uma estreita relação genética entre estes três indivíduos.

Por ultimo, o *Hancornia* 42 e *Hancornia* 43 apresentaram também alelos em comum, sendo detectado a presença de cinco cores (marrom, vermelho, amarelo, rosa e azul marinho, na Figura 6) na sua constituição genética. Também cruzando as informações com os outros métodos analisados, constatou-se que eles apareciam no mesmo grupo sendo muito próximos entre si.

O emprego de mais de um método de agrupamento, em razão das diferenças na hierarquização, otimização e ordenação dos grupos, permite que a classificação deles se complemente em função dos critérios que cada técnica utiliza, e impede que inferências errôneas sejam adotadas na alocação de materiais, dentro de um determinado subgrupo de genótipos (ARRIEL et al., 2006).

CONCLUSÕES

Os marcadores moleculares ISSR mostraram-se eficientes na separação de indivíduos de acordo com suas origens geográficas, sendo eficientes também na separação dentro de cada região estudada.

O alto grau de polimorfismo, detectado através da caracterização molecular demonstrou que a variabilidade genética das regiões naturais de mangabeira (*H. speciosa*) ocorrentes no Estado de Pernambuco pode disponibilizar material genético para futuros trabalhos de melhoramento nesta cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR FILHO, S. P. de; BOSCO, J.; ARAÚJO, I. A. de. Banco ativo de germoplasma de mangaba no estado da Paraíba. In: WORKSHOP PARA CURADORES DE BANCOS DE GERMOPLASMA DE ESPÉCIES FRUTÍFERAS, 1997, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999, p. 156-159.

ADDINSOFT. XLSTAT for Windows. Disponível em: <<http://www.xlstat.com/>>. Acesso em: 15 Jan. 2009.

ARRIEL, N.H.C. et al. CAPELOTO, A.; CORRADO, A.R. Técnicas multivariadas na determinação da diversidade genética em gergelim usando marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, P.801-809, 2006.

BARREIRA, S. et al. Diversidade genética e sistema de reprodução em população nativa de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish sob exploração. **SCIENTIA FORESTALIS**, Piracicaba, v.71, P.119-130, 2006.

COSTA, T. S. et al. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.46, n.5, p.499-508, maio 2011.

COSTA, T. S. **Diversidade genética de acessos do banco ativo de germoplasma de mangabeira**. 2010. 44 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Sergipe, Brasil.

JAEGER, P. **Caracterização genética e demográfica de populações de *Xylopia emarginada* Mart. (Anonáceae)**. 2004. 113 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2004.

KANASHIRO, M. Genética e melhoramento de essências florestais nativas: aspectos conceituais e práticos. **Revista do Instituto Florestal Brasileiro**, São Paulo, v. 4, n. único, p. 1168-1178, 1992.

LEDERMAN, I. E. et al. de M. **Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes)**. Jaboticabal: São Paulo. 2000. 35 p. (Série frutas Nativas).

MARTINS, G. V. et al. Diversity and Genetic Structure in Natural Populations of *Hancornia speciosa* var. *speciosa* GOMES in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 4, p. 1143-1153, Dez 2012.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Londres, v.8, n. 19, p. 4321-4325, 1980.

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

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Baltimore v. 155, p. 945-959, 2000.

REIS, M. S. **Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmitero (*Euterpe edulis* MARTIUS)**. 1996. 210 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Verion 2.1**. New York: Exeter Software. 38 p. 2000.

SANGUINETTI, C.J.; NETO, E.D.; SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **BioTechniques**, New York, v.17, p.914-921, 1994.

SEBBENN, A. M. **Estrutura genética de subpopulações de *Genipa americana* L. (Rubiáceas) a partir de isoenzimas**. 1997. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

WÜNSCH, A.; HORMAZA, J. I. Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple. **Scientia Horticulturae**, Georgia, v. 113, p. 37-43, 2007.

YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. PopGene VERSION 1.31, 1999. Disponível em:http://www.cbiot.ufrgs.br/programas/Windows/Biologia_molecular/PopGen32/> Acesso em: 03 set. 2008.

ZIMMER, P. D.; OLIVEIRA, A. C.; MALONE, G. **Ferramentas da biotecnologia no melhoramento genético vegetal**. Pelotas: Editora Gráfica Universitária; UFPEL, 2005. 158 p.

ANEXO

NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CAATINGA

INSTRUÇÕES AOS AUTORES ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO CIENTÍFICO

- **Digitação:** o texto deve ser composto em programa Word (DOC ou RTF) ou compatível e os gráficos em programas compatíveis com o Windows, como Excel, e formato de imagens: Figuras (GIF) e Fotos (JPEG). Deve ter no máximo de 20 páginas, A4, digitado em espaço 1,5, fonte Times New Roman, estilo normal, tamanho doze e parágrafo recuado por 1 cm. Todas as margens deverão ter 2,5 cm.

Páginas e linhas devem ser numeradas; os números de páginas devem ser colocados na margem inferior, à direita e as linhas numeradas de forma contínua. Se forem necessárias outras orientações, entre em contato com o Comitê Editorial ou consulte o último número da Revista Caatinga. As notas devem apresentar até 12 páginas, incluindo tabelas e figuras. As revisões são publicadas a convite da Revista. O manuscrito não deverá ultrapassar 2,0 MB.

- **Estrutura:** o artigo científico deverá ser organizado em título, nome do(s) autor(es), resumo, palavras-chave, título em inglês, abstract, keywords, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusão, agradecimentos (opcional), e referências.

- **Título:** deve ser escrito em maiúsculo, negrito, centralizado na página, no máximo com 15 palavras, não deve ter subtítulo e abreviações. Com a chamada de rodapé numérica, extraída do título, devem constar informações sobre a natureza do trabalho (se extraído de tese/dissertação) e referências às instituições colaboradoras. O nome científico deve ser indicado no título apenas se a espécie for desconhecida.

Os títulos das demais seções da estrutura (resumo, abstract, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusão, agradecimentos e referências) deverão ser escritos em letra maiúscula, negrito e justificado à esquerda.

- **Autores(es):** nomes completos (sem abreviaturas), em letra maiúscula, um após o outro, separados por vírgula e centralizados na linha. Como nota de rodapé na primeira página, indicar, para cada autor, afiliação completa (departamento, centro, instituição, cidade, país), endereço completo e e-mail

do autor correspondente. Este deve ser indicado por um “*”. Só serão aceitos, no máximo, cinco autores. Caso ultrapasse esse limite, os autores precisam comprovar que a pesquisa foi desenvolvida em regiões diferentes.

Na primeira versão do artigo submetido, os nomes dos autores e a nota de rodapé com os endereços deverão ser omitidos. Para a inserção do(s) nome(s) do(s) autor(es) e do(s) endereço(s) na versão final do artigo deve observar o padrão no último número da Revista Caatinga (<http://caatinga.ufersa.edu.br/index.php/sistema>).

- Resumo e Abstract: no mínimo 100 e no máximo 250 palavras.
- Palavras-chave e Keywords: em negrito, com a primeira letra maiúscula. Devem ter, no mínimo, três e, no máximo, cinco palavras, não constantes no Título/Title e separadas por ponto (consultar modelo de artigo).

Obs. Em se tratando de artigo escrito em idioma estrangeiro (Inglês ou Espanhol), o título, resumo e palavras-chave deverão, também, constar em Português, mas com a seqüência alterada, vindo primeiro no idioma estrangeiro.

- Introdução: no máximo, 550 palavras, contendo citações atuais que apresentem relação com o assunto abordado na pesquisa.
- Citações de autores no texto: devem ser observadas as normas da ABNT, NBR 10520 de agosto/2002.

Ex: Torres (2008) ou (TORRES, 2008); com dois autores, usar Torres e Marcos Filho (2002) ou (TORRES; MARCOS FILHO, 2002); com mais de três autores, usar Torres et al. (2002) ou (TORRES et al., 2002).

- Tabelas: serão numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na parte superior. Não usar linhas verticais. As linhas horizontais devem ser usadas para separar o título do cabeçalho e este do conteúdo, além de uma no final da tabela. Cada dado deve ocupar uma célula distinta. Não usar negrito ou letra maiúscula no cabeçalho. Recomenda-se que as tabelas apresentem 8,2 cm de largura, não sendo superior a 17 cm (consulte o modelo de artigo), acessando a página da Revista Caatinga (<http://periodico.caatinga.ufersa.edu.br/index.php/sistema>).

- Figuras: gráficos, fotografias ou desenhos levarão a denominação geral de Figura sucedida de numeração arábica crescente e legenda na parte inferior.

Para a preparação dos gráficos deve-se utilizar “softwares” compatíveis com “Microsoft Windows”. A resolução deve ter qualidade máxima com pelo menos 300 dpi. As figuras devem apresentar 8,5 cm de largura, não sendo superior a 17 cm. A fonte empregada deve ser a Times New Roman, corpo 10 e não usar negrito na identificação dos eixos. As linhas dos eixos devem apresentar uma espessura de 1,5 mm de cor preta. A Revista Caatinga reserva-se ao direito de não aceitar tabelas e/ou figuras com o papel na forma “paisagem” ou que apresentem mais de 17 cm de largura. Tabelas e Figuras devem ser inseridas logo após à sua primeira citação.

- Equações: devem ser digitadas usando o editor de equações do Word, com a fonte Times New Roman. As equações devem receber uma numeração arábica crescente. As equações devem apresentar o seguinte padrão de tamanho:

Inteiro = 12 pt

Subscrito/sobrescrito = 8 pt

Sub-subscrito/sobrescrito = 5 pt

Símbolo = 18 pt

Subsímbolo = 14 pt

Estas definições são encontradas no editor de equação no Word

- Agradecimentos: logo após as conclusões poderão vir os agradecimentos a pessoas ou instituições, indicando, de forma clara, as razões pelas quais os faz.

- Referências: devem ser digitadas em espaço 1,5 cm e separadas entre si pelo mesmo espaço (1,5 cm). Precisam ser apresentadas em ordem alfabética de autores, Justificar (Ctrl + J) - NBR 6023 de agosto/2002 da ABNT. UM PERCENTUAL DE 60% DO TOTAL DAS REFERÊNCIAS DEVERÁ SER ORIUNDO DE PERIÓDICOS CIENTÍFICOS INDEXADOS COM DATA DE PUBLICAÇÃO INFERIOR A 10 ANOS.

O título do periódico não deve ser abreviado e recomenda-se um total de 20 a 30 referências. EVITE CITAR RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS E PUBLICADOS EM CONGRESSOS E SIMILARES.

REGRAS DE ENTRADA DE AUTOR

Até 3 (três) autores

Mencionam-se todos os nomes, na ordem em que aparecem na publicação, separados por ponto e vírgula.

Ex: TORRES, S. B.; PAIVA, E. P. PEDRO, A. R. Teste de deterioração controlada para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de jiló. Revista Caatinga, Mossoró, v. 0, n. 0, p. 00-00, 2010.

Acima de 3 (três) autores

Menciona-se apenas o primeiro nome, acrescentando-se a expressão et al.

Ex: BAKKE, I. A. et al. Water and sodium chloride effects on Mimosa tenuiflora (Willd.) poiret seed germination. Revista Caatinga, Mossoró, v. 19, n. 3, p. 261-267, 2006.

Grau de parentesco

HOLANDA NETO, J. P. Método de enxertia em cajueiro-anão-precoce sob condições de campo em Mossoró-RN. 1995. 26 f. Monografia (Graduação em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura de Mossoró, Mossoró, 1995.

COSTA SOBRINHO, João da Silva. Cultura do melão. Cuiabá: Prefeitura de Cuiabá, 2005.

MODELOS DE REFERÊNCIAS:

a) Artigos de Periódicos: Elementos essenciais:

AUTOR. Título do artigo. Título do periódico, Local de publicação (cidade), n.º do volume, n.º do fascículo, páginas inicial-final, mês (abreviado), ano.

Ex: BAKKE, I. A. et al. Water and sodium chloride effects on Mimosa tenuiflora (Willd.) poiret seed germination. Revista Caatinga, Mossoró, v. 19, n. 3, p. 261-267, set. 2006.

b) Livros ou Folhetos, no todo: Devem ser referenciados da seguinte forma:

AUTOR. Título: subtítulo. Edição. Local (cidade) de publicação: Editora, data. Número de páginas ou volumes. (nome e número da série)

Ex: RESENDE, M. et al. Pedologia: base para distinção de ambientes. 2. ed. Viçosa, MG: NEPUT, 1997. 367 p.

OLIVEIRA, A. I.; LEONARDOS, O. H. Geologia do Brasil. 3. ed. Mossoró: ESAM, 1978. 813 p. (Coleção mossoroense, 72)

c) Livros ou Folhetos, em parte (Capítulo de Livro):

AUTOR DO CAPÍTULO. Título do capítulo. In: AUTOR DO LIVRO. Título: subtítulo do livro. Número de edição. Local de publicação (cidade): Editora, data. Indicação de volume, capítulo ou páginas inicial-final da parte.

Ex: BALMER, E.; PEREIRA, O. A. P. Doenças do milho. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. (Ed.). Melhoramento e produção do milho. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v. 2, cap. 14, p. 595-634.

d) Dissertações e Teses: (somente serão permitidas citações recentes, PUBLICADAS NOS ÚLTIMOS TRÊS ANOS QUE ANTECEDEM A REDAÇÃO DO ARTIGO). eferenciam-se da seguinte maneira:

AUTOR. Título: subtítulo. Ano de apresentação. Número de folhas ou volumes. Categoria (grau e área de concentração) - Instituição, local.

Ex: OLIVEIRA, F. N. Avaliação do potencial fisiológico de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.). 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia: Área de Concentração em Tecnologia de Sementes) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2011.

e) Artigos de Anais ou Resumos: (DEVEM SER EVITADOS)

NOME DO CONGRESSO, n.º., ano, local de realização (cidade). Título... subtítulo. Local de publicação (cidade): Editora, data de publicação. Número de páginas ou volumes.

Ex: BALLONI, A. E.; KAGEYAMA, P. Y.; CORRADINI, I. Efeito do tamanho da semente de *Eucalyptus grandis* sobre o vigor das mudas no viveiro e no campo. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 3., 1978, Manaus. Anais... Manaus: UFAM, 1978. p. 41-43.

f) Literatura não publicada, mimeografada, datilografada etc.:

Ex: GURGEL, J. J. S. Relatório anual de pesca e piscicultura do DNOCS. Fortaleza: DNOCS, 1989. 27 p. Datilografado.

g) Literatura cuja autoria é uma ou mais pessoas jurídicas:

Ex: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

h) Literatura sem autoria expressa:

Ex: NOVAS Técnicas – Revestimento de sementes facilita o plantio. Globo Rural, São Paulo, v. 9, n. 107, p. 7-9, jun. 1994.

i) Documento cartográfico:

Ex: INSTITUTO GEOGRÁFICO E CARTOGRÁFICO (São Paulo, SP). Regiões de governo do Estado de São Paulo. São Paulo, 1994. 1 atlas. Escala 1:2.000.

J) Em meio eletrônico (CD e Internet): Os documentos /informações de acesso exclusivo por computador (on line) compõem-se dos seguintes elementos essenciais para sua referência:

AUTOR. Denominação ou título e subtítulo (se houver) do serviço ou produto, indicação de responsabilidade, endereço eletrônico entre os sinais < > precedido da expressão – Disponível em: – e a data de acesso precedida da expressão – Acesso em:.

Ex: BRASIL. Ministério da Agricultura e do abastecimento. SNPC – Lista de Cultivares protegidas. Disponível em: <<http://agricultura.gov.br/scpn/list/200.htm>>. Acesso em: 08 set. 2008.

GUNCHO, M. R. A educação à distância e a biblioteca universitária. In: SEMINÁRIO DE BIBLIOTECAS UNIVERSITÁRIAS, 10., 1998, Fortaleza. Anais... Fortaleza: Tec Treina, 1998. 1 CD-ROM.