



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE

BIOMETRIA, CRESCIMENTO INICIAL E DIVERSIDADE GENÉTICA EM MANGABEIRA

ADRIELLE NAIANA RIBEIRO SOARES





MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE

ADRIELLE NAIANA RIBEIRO SOARES

BIOMETRIA, CRESCIMENTO INICIAL E DIVERSIDADE GENÉTICA EM MANGABEIRA

Tese apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de õDoutora em Ciênciasö.

Orientadora Dr^a. Ana Veruska Cruz da Silva

SÃO CRISTÓVÃO SERGIPE 6 BRASIL 2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Soares, Adrielle Naiana Ribeiro.

S676b

Biometria, crescimento inicial e diversidade genética em mangabeira / Adrielle Naiana Ribeiro Soares; orientadora Ana Veruska Cruz da Silva. ó São Cristóvão, 2018.

84 f.; il.

Tese (doutorado em Agricultura e Biodiversidade)ó Universidade Federal de Sergipe, 2018.

1. Mangabeira. 2. Biometria. 3. Diversidade biológica. 4. Germoplasma vegetal. I. Silva, Ana Veruska Cruz da, orient. II. Hancornia speciosa. III. Título.

CDU 634.6

ADRIELLE NAIANA RIBEIRO SOARES

BIOMETRIA, CRESCIMENTO INICIAL E DIVERSIDADE GENÉTICA EM MANGABEIRA

Tese apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de õDoutora em Ciênciasö.

APROVADA em 22 de Fevereiro de 2018.

Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz Universidade Tiradentes Prof^a. Dr^a. Marília Freitas de Vasconcelos Melo Universidade Federal de Alagoas

Prof^a. Dr^a. Ana da Silva Lédo Embrapa Tabuleiros Costeiros/Universidade Federal de Sergipe

Dr^a. Tatiana Santos Costa Embrapa Tabuleiros Costeiros

Dr^a. Ana Veruska Cruz da Silva Embrapa Tabuleiros Costeiros/Universidade Federal de Sergipe (Orientadora)

> SÃO CRISTÓVÃO SERGIPE 6 BRASIL

À Deus, por ter permitido a realização de mais um sonho e me dado forças para seguir sempre em frente. **Dedico**

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir a conclusão de mais uma etapa, e por ter me capacitado durante os anos de estudo. A ele toda honra e glória;

Aos meus pais Ezequiel e Verônica por serem meus principais incentivadores, e por acreditarem que eu sou capaz de atingir meus objetivos, meu muito obrigada por nossa parceria de sempre e para sempre;

Ao meu esposo Gustavo Tenório que sempre esteve ao meu lado, me apoiando em todas as situações. Obrigada por todo o amor, compreensão e incentivo;

Ao meu irmão Ezequiel Júnior, minha cunhada Cynthia Gabriela e meu amado sobrinho Ezequiel Neto pelo carinho e aconchego familiar;

Aos meus sogros Daudite Pessoa e Socorro Pessoa por todo o carinho, orações e incentivo;

A toda a minha família por torcer e acreditar em mim;

À minha orientadora Dr^a. Ana Veruska por todas as oportunidades que me concedeu, assim como os momentos de aprendizado, descontração, amizade e dedicação, que em muito contribuíram para minha vida acadêmica e pessoal;

À Universidade Federal de Sergipe (UFS), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade (PPGAGRI) pela acolhida e oportunidade de crescimento profissional;

À Embrapa Tabuleiros Costeiros por todo o suporte na realização das minhas pesquisas;

A todos que fazem parte da equipe do campo experimental Itaporanga DøAjuda pela disponibilidade em contribuir com os trabalhos no campo;

À Universidade da Flórida, e aos Professores Dr. Pamela Soltis e Dr. Douglas Soltis pela receptividade durante toda a temporada;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche, e à CAPES pela bolsa durante o curso de doutorado;

Às amigas Flaviana, Danúbia e Erica pela convivência, apoio, companheirismo e todos os momentos de alegria;

A todos que fazem/fizeram parte do grupo LABMOL da Embrapa Tabuleiros Costeiros: Marília Vasconcelos, Ana Letícia Nascimento, Milena Cardoso, Grasiela Santana, Sílvio Gomes, Marina Ferreira, Isis Bacelar, Priscilla Santana, Tatiana Costa, Jéssica Monalisa, Isa Mayara Ribeiro, Daniela Assunção e Alex de Jesus, pelos momentos de trabalho e descontração;

Aos amigos Altamira McCarthy e Tim McCarthy por toda a atenção e amizade;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta conquista.

BIOGRAFIA

ADRIELLE NAIANA RIBEIRO SOARES (SOARES, A.N.R.), filha de Ezequiel de Souza Soares e Verônica Maria de Aquino Ribeiro Soares, nasceu em Mossoró, estado do Rio Grande do Norte, em 23 de julho de 1986.

Em 2005, iniciou o curso de Agronomia pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido-UFERSA, graduando-se em janeiro de 2010.

Em fevereiro de 2014, tornou-se mestre em Produção Agrícola, pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Em março de 2014, ingressou no curso de Doutorado em Agricultura e Biodiversidade pela Universidade Federal de Sergipe, atuando na área de Recursos Genéticos e Propagação vegetal.

Durante o curso de Doutorado participou do Programa Ciência sem Fronteiras, com bolsa pelo CNPq e desenvolveu parte da tese no Laboratório de Sistemática Molecular, pertencente à Universidade da Flórida.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	
RESUMO	
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Aspectos gerais da mangabeira	
2.2. Recursos genéticos.	3
2.3. Propagação da mangabeira	4
2.4. Caracterização biométrica	5
2.5. Diversidade genética	6
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
4. ARTIGO 1: BIOMETRIA EMERGÊNCIA E CRESCIMENTO INICIAL DE	
	14
	14
	15
	16
	17
4.2.1. Material vegetal.	17
4.2.2. Biometria de frutos e sementes	17
4.2.3. Emergência e crescimento inicial.	17
4.3. Resultados	
	18
1.5.1. Diometria de fratos e sementes	18
4.4. Discussão.	
4.4.1. Biometria de frutos e sementes.	
4.4.2. Emergência e crescimento incial	20
	21
	21
5. ARTIGO 2: DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS E DAS PRIMEIRAS	
PROGÊNIES DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DE MANGABA DA	
EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS	29
Resumo	
Abstract	
5.1. Introdução	
5.2. Material e Métodos	
5.3. Resultados e discussão	
5.4. Conclusões	
5.5. Agradecimentos	
5.6. Referências	

6. ARTIGO 3: DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE	
MANGABA EM SERGIPE, O MAIOR ESTADO PRODUTOR DO BRASIL	. 41
Resumo	. 41
Abstract	. 42
6.1. Introdução	. 43
6.2. Material e Métodos	. 43
6.2.1. Amostras, coletas e extração de DNA	43
6.2.2. Amplificação da PCR	45
6.2.3. Análise de dados	
6.3. Resultados e discussão	
6.4. Agradecimentos	. 51
6.5. Referências	. 51
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	. 55
ANEXOS	56

LISTA DE FIGURAS

ARTI	GO 1				
Figura	P	ágina			
1	Exemplos de avaliação biométrica frutos (A) e sementes (B) de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga døAjuda, SE	24			
Progênie de mangaba aos seis meses após a semeadura (A); avaliação de diâmetro do caule (B) e da altura da planta (C)					
3	Valores médios de peso do fruto (A); comprimento do fruto (B); largura do fruto (C); espessura do fruto (D) e número de sementes por frutos (E) de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga døAjuda, SE	26			
4	Valores médios do peso de sementes por fruto (A); comprimento da semente (B); largura da semente (C) e espessura da semente (D) de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga døAjuda, SE	27			
5	Análise de Componentes Principais (PCA) para a biometria de frutos e sementes de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga døAjuda, SE				
ARTI	GO 2				
Figura		ágina			
1	Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros,	agma			
1	Itaporanga døAjuda, SE	32			
2	Frutos de mangabeira na árvore (A), colhidos (B), despolpa (C) e progênie aos seis meses (D).	32			
ARTIO		32			
Figura		ágina			
1 igura	Localização de populações naturais de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes no estado	agma			
1	de Sergipe, Brasil, onde foram coletadas as amostras para análise da estrutura e diversidade genética	43			
2	Coeficiente de variação para o número de fragmentos polimórficos utilizando marcadores ISSR entre 10 populações naturais de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes				
	do estado de Sergipe, Brasil	45			
3	Análise de coordenadas principais (ACoP) para populações nativas de Hancornia speciosa Gomes do estado de Sergipe, Brasil	48			
4	Representação filogenética pelo agrupamento UPGMA, similaridade genética pelo coeficiente de Jaccard (1908) e análise õbootstrapö (10.000 x) para 10 populações naturais de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes do estado de Sergipe,				
	Brasil	19			

LISTA DE TABELAS

ARTIC	GO 1	
Tabela		Página
1	Origem, identificação da matriz e codificação dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga døAjuda, SE	24
2	Correlação de Pearson para as variáveis: comprimento de frutos (CF); largura de frutos (LF); espessura de frutos (EF); peso de frutos (PF); número de sementes por fruto (NSF); comprimento de sementes (CS); espessura de sementes (ES); largura de sementes (LS) e peso de sementes (PS) de acessos de mangabeira do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga døAjuda, SE	28
3	Porcentagem de emergência (PE%), índice de velocidade de emergência (IVE), porcentagem de sobrevivência (S%), altura (ALT), diâmetro do caule (DC) e número de folhas (NF) de progênies de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga døAjuda, SE.	28
ARTIC	GO 2	
Tabela		Página
1	Origem dos acessos (matrizes) do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros e o número de progênies utilizadas para estudo de diversidade genética	33
2	Temperatura de anelamento (Ta), motivos de repetição, amplitude alélica (pb) e fluorescência de iniciadores microssatélites testados para a caracterização genética de mangabeira	34
3	Número de amostras (n), número de alelos (A), riqueza alélica (R), heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho) e coeficiente de endogamia (f) em relação aos quatro locos avaliados para progênies de nove acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga døAjuda, SE	34
4	Matriz de divergência correlacionando <i>Fst</i> (índice de divergência genética) entre progênies de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga døAjuda, SE	36
5	Matriz de identidade genética (GI) de Nei entre progênies de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga døAjuda, SE	36
6	Relação entre progênies e matrizes de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga døAjuda, SE	37
ARTIC	GO 3	Dánin
Tabela 1	Identificação, localização geográfica e número de amostras de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes coletadas em Sergipe, Brasil.	Página 43
2	Iniciadores ISSR utilizados em populações naturais de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes do estado de Sergipe, Brasil, com suas respectivas sequências, temperatura de anelamento (Ta), total de fragmentos (TF), fragmentos polimórficos (FP) e porcentagem de polimorfismo (PPF)	45
3	Número de indivíduos (N) índice de Shannon (I) e heterozigosidade	73

	esperada (He) em populações naturais de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes,	
	obtidos por marcadores ISSR	46
4	Pares de genótipos com valores extremos de maiores e menores similaridade	
	(s) baseados no índice de Jaccard, para 15 marcadores ISSR em 155	
	indivíduos de Hancornia speciosa Gomes	47
5	Análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro das 10 populações	
	de Hancornia speciosa Gomes no estado de Sergipe, Brasil	48

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BAG	Banco	Ativo	de	Germo	plasma
-----	-------	-------	----	-------	--------

MCM Movimento das Catadoras de Mangaba

CGEN Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

MMA Ministério do Meio Ambiente (MMA)

RAS Regras para Análises de Sementes

ACP Análise de Componentes Principais

CF Comprimento de Frutos (mm)

LF Largura de Frutos (mm)

EF Espessura de Frutos (mm)

PF Peso de Frutos (g)

NSF Número de Sementes por Frutos

CS Comprimento de Sementes (mm)

ES Espessura de Sementes (mm)

LS Largura de Sementes (mm)

PS Peso de Sementes (g)

PE Porcentagem de Emergência (%)

IVE Índice de Velocidade de Emergência

S Porcentagem de Sobrevivência (%)

ALT Altura de Plantas (cm)

DC Diâmetro do Caule (cm)

NF Número de folhas

Fst Índice de divergência genética

SSR Sequência Simples Repetida

RAPD Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso

ISSR Inter Sequência Simples Repetida

PCR Reação em Cadeia Polimerase

A Número de alelos

n Número de amostras

R Riqueza alélica

He Heterozigosidade esperada

Ho Heterozigosidade observada

f Coeficiente de endogamia

FST Índice de divergência genética

RPPN Reserva Particular do Patrimônio Natural

Ta Temperatura de anelamento

pb Amplitude alélica

GI Identidade Genética de Nei

I Índice de Shannon

TF Total de Fragmentos

FP Fragmentos Polimórficos

PPF Porcentagem de Polimorfismo

s Similaridade

ACoP Análise de Coordenadas Principais

AMOVA Análise de Variância Molecular

UPGMA Método de grupo de pares com médias aritméticas não ponderadas

RESUMO

SOARES, Adrielle Naiana Ribeiro. **Biometria, crescimento inicial e diversidade genética em mangabeira.** São Cristóvão: UFS, 2018. 84p. (Tese - Doutorado em Agricultura e Biodiversidade).*

A mangabeira (Hancornia speciosa Gomes) é uma espécie frutífera, nativa do Brasil, de ocorrência em restingas, cerrado e tabuleiros costeiros. No estado de Sergipe a mangabeira possui importância social, cultural e econômica. A fragmentação de áreas naturais de ocorrência da espécie tem se intensificado, e neste contexto, foi implantado o Banco Ativo de Germoplasma Mangaba (BAGMangaba). As pesquisas deste trabalho foram realizadas na Embrapa Tabuleiros Costeiros e na Universidade da Flórida, com o objetivo de avaliar aspectos sobre a propagação e a diversidade genética da espécie. No primeiro experimento avaliou-se a propagação e a biometria dos frutos e sementes de acessos do BAGMangaba. No estudo biométrico avaliou-se o peso e as dimensões (comprimento, largura e espessura) de frutos e sementes, além do número de sementes por fruto. Para as análises de propagação, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições de 25 sementes, totalizando 100 sementes por tratamento. Neste estudo, as sementes foram beneficiadas, logo após, semeadas em saco de polietileno, contendo areia como substrato, e em seguida submetidas aàs seguintes determinações: porcentagem de emergência (E%), índice de velocidade de emergência (IVE), altura de mudas (ALT), diâmetro do caule (DC), número de folhas (NF) e porcentagem de sobrevivência (S%). O segundo estudo foi realizado na Universidade da Flórida com o objetivo de avaliar a diversidade genética de acessos e progênies de mangaba, utilizando marcadores microssatélies (SSR). Foram utilizadas 96 amostras, sendo 9 matrizes e 87 progênies, e a diversidade genética foi mensurada por meio dos seguintes parâmetros genéticos: número de alelos (N), riqueza alélica (R), heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho), índice de divergência genética (Fst), coeficiente de endogamia (f), identidade genética de Nei (GI), relação de parentesco entre progênies e matrizes, agrupamentos por meio da análise Bayesiana. No terceiro experimento estimou-se a diversidade genética de 155 indivíduos em 10 populações naturais de mangabeira no estado de Sergipe, utilizando marcadores ISSR. A diversidade genética foi mensurada pelos seguintes parâmetros: porcentagem de polimorfismo, coeficiente de variação, índice de Shannon (I), heterozigosidade esperada (He), similaridade entre indivíduos, agrupamento UPGMA, análise de coordenadas principais (ACoP) e AMOVA. Os acessos mostraram-se divergentes quanto às características biométricas, e houve significativa assimetria entre as progênies nas variáveis de propagação, destacandos-se as progênies dos acessos provenientes dos estados do Pará (ABP1, ABP2 e ABP4), Sergipe (PTP1, PTP2, TCP2 e TCP6) e Bahia (LGP1, LGP3, LGP4 e BIP2). Para as análises moleculares verificou-se que os marcadores SSR revelaram moderada variabilidade genética entre progênies, sendo aquelas progênies provenientes dos acessos do Pará (ABP1 e ABP2) as mais divergentes. Em populações naturais de Sergipe com o uso de marcadores ISSR verificou-se alta taxa de polimorfismo (100%) e a formação de cinco grandes grupos. A mangabeira é uma espécie ainda em fase de domesticação, e estudos que envolvam a propagação, morfologia e diversidade genética são importantes para o desenvolvimento de estratégias de conservação e seleção de plantas com características de interesse em programas de melhoramento genético.

Palavras-chave: *Hancornia speciosa*, conservação *ex situ*, frutas nativas, marcadores moleculares.

^{*}Comitê orientador: Dr^a. Ana Veruska Cruz da Silva ó Embrapa Tabuleiros Costeiros (Orientadora).

ABSTRACT

SOARES, Adrielle Naiana Ribeiro. **Biometry, initial gGrowth and the genetic diversity of mangabeira** São Cristóvão: UFS, 2018. 84p. (Thesis - Doctor of Science in Agriculture and Biodiversity).*

The mangabeira (Hancornia speciosa Gomes) is a fruit species that is native to Brazil. In the State of Sergipe, the mangabeira has a social, cultural and economic importance. The fragmentation of the natural areas of the species has intensified and in this context, the Mangaba Genebank (BAG Mangaba) was implemented. The two specific research investigations of this work were carried out at the Embrapa Coastal Tablelands and at the University of Florida, USA, in order to evaluate the various aspects concerning the propagation and the genetic diversity of the species. In the first experiment, the propagation and the biometrics of the fruits and seeds of the BAG Mangaba accessions were evaluated. In the biometric studies, the weight and the dimensions (length, width and thickness) of fruits and seeds were evaluated, as well as the number of seeds per fruit. The propagation analyzes and the experimental design were completely randomized, with 4 replicates of 25 seeds, totaling 100 seeds per treatment. In this study, the seeds were sown in polyethylene bags that contained sand as a substrate. They were then submitted to the following determinations: emergence (E%), emergency speed indexes (ESI), seedling heights (cm), diameters (DIA) and the percentages of survival (S%), together with the fruit and seed biometrics (weight, length and width, together with the thickness of the fruits and seeds, as well as the number of seeds per fruit). The second study was conducted at the University of Florida, USA, with the objective of evaluating the genetic diversities of the accessions and the progenies of the mangaba fruit, by using microsatellite markers (SSR). A total of 96 samples were used, 9 matrices and 87 progenies. The genetic diversities were measured by using the following genetic parameters: the allele numbers (N), the allelic richness (R), the expected heterozygosity (He), the observed (Ho) genetic divergence indexes (Fst), the endogamy coefficients (f), Neiøs genetic identities (GI), the parental relationship between the progenies and the matrices, as well as the means of the clusters, conducted by Bayesian analyzes. In a third experiment, the researchers calculated the genetic diversities of 155 individuals from 10 natural populations of mangabeira in the State of Sergipe, by using ISSR markers. The genetic diversities were measured as a result of the following parameters: the polymorphism percentages, the coefficients of variation, Shannon indices (I), the expected heterozygosities (He), the similarity among the individuals, the UPGMA groupings, the principal coordinate analyzes (PCoA), as well as by using AMOVA. The accessions showed divergences regarding their biometric characteristics and there was a significant asymmetry between the progenies in their propagative variables, highlighting the progeny accessions from the States of Pará (ABP1, ABP2 and ABP4), Sergipe (PTP1, PTP2, TCP2 and TCP6) and Bahia (LGP1, LGP3, LGP4 and BIP2). For the molecular analyzes, it was verified that the SSR markers showed a moderate genetic variability between the progenies and the matrices, with the progenies from the accessions in the State of Pará (ABP1 and ABP2) being the most divergent. In the natural populations of Sergipe, when making the use of the ISSR markers, a high polymorphism rate (100%) and the formation of five large groups were observed. The mangabeira is a species that is still in the stage of domestication and studies that involve their propagation, their morphology and their genetic diversities are important for the development of strategies for the conservation and the selection of plants, with characteristics of interest in various breeding programs.

Keywords: Hancornia speciosa, ex-situ conservation, native fruits, molecular markers

^{*}Adivisor committee: Dra. Ana Veruska Cruz da Silva ó Embrapa Tabuleiros Costeiros (Orientadora)

1. INTRODUÇÃO GERAL

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes - Apocynaceae) é uma espécie nativa do Brasil, de ocorrência natural em diferentes biomas como o Cerrado e a Mata Atlântica. Em 2016 a produção foi equivalente a 922 toneladas, produção 39,1% superior que a de 2015, que foi de 663 toneladas (IBGE, 2018). Em Sergipe, a árvore é símbolo do estado e representa importância econômica, social e cultural. O fruto pode ser consumido *in natura*, mas é utilizado principalmente para a produção de polpa congelada, sorvetes, doces, geleias e licores.

A propagação da mangabeira é geralmente realizada por sementes, e estas são classificadas como recalcitrantes. As sementes recalcitrantes possuem curta longevidade, pois não suportam a dessecação e o armazenamento por tempo prolongado, necessitando que a semeadura ocorra logo após serem extraídas dos frutos. Estudar mecanismos envolvidos na propagação da mangabeira, bem como o período adequado de colheita dos frutos, constituem informações necessárias para entender a dinâmica da multiplicação da espécie, já que a propagação é um dos principais gargalos do seu sistema de produção.

Apesar do potencial agroindustrial, o extrativismo apresenta-se como a principal forma de exploração da mangabeira. Não há registro, até o momento, de nenhuma variedade comercial. A exploração inadequada dos frutos associada à fragmentação de seus habitats promove a existência de populações com menor número de indivíduos e compromete a sobrevivência das futuras gerações desta espécie por mecanismos naturais de regeneração. Esta condição, ao longo do tempo, pode levar à redução da diversidade genética nas populações naturais e propiciar a existência de indivíduos menos vigorosos, com possível perda de caracteres de importância econômica. Nesse sentido, a definição de estratégias de conservação *ex situ* é fundamental para a manutenção da diversidade genética ainda existente nas populações naturais.

Estudos de diversidade genética das populações remanescentes de mangabeira são de extrema importância para estabelecer estratégias de preservação da espécie (AMORIM et al., 2015). Além disso, a domesticação e incorporação desta espécie nos sistemas produtivos estão diretamente relacionadas ao conhecimento da amplitude e distribuição da diversidade genética nas populações naturais (COSTA et al., 2011). Devido à fragmentação das áreas naturais, em 2006 foi implantado pela Embrapa Tabuleiros Costeiros, o Banco Ativo de Germoplasma de mangabeira (BAGMangaba), localizado no estado de Sergipe, como uma alternativa *ex situ* de conservação da espécie (SILVA et al., 2017a).

Para a mangabeira, os avanços no conhecimento da diversidade genética são fundamentais para o desenvolvimento de um programa de melhoramento da espécie. Estudos genéticos em progênies servem como base para a conservação e seleção de indivíduos potenciais para exploração econômica e melhoramento genético.

A pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de avaliar aspectos sobre a propagação e estimar a variabilidade genética de populações nativas, acessos e progênies de mangabeira, por meio de marcadores moleculares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da mangabeira

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma espécie frutífera nativa do Brasil, pertencente à família Apocynaceae. É uma planta de clima tropical, que expressa maior desenvolvimento vegetativo nos períodos com temperaturas mais elevadas (24 a 26 °C), pluviosidade entre 750 e 1600 mm anuais e solos pobres e arenosos, característicos de regiões de Cerrado e Tabuleiros Costeiros (SOARES et al., 2006). No Brasil, pode ser encontrada nas regiões Sudeste, Norte, Nordeste e Centro-Oeste (SILVA et al., 2013).

É uma árvore de porte médio, copa ampla, os galhos são abundantes e com folhagens reduzidas. Possui troncos tortuosos, ramificados e ásperos; folhas opostas, simples, pecioladas, glabras, brilhantes e coriáceas, de forma e tamanho variados (SILVA JÚNIOR; LÉDO, 2006). As flores são hermafroditas, de cor branca, formato de campânula alongada (tubular). A inflorescência é do tipo dicásio, com 1 a 7 flores (ALMEIDA et al., 1998). O fruto é do tipo baga, de formato arredondado ou elipsoide; cada fruto contém de duas a seis sementes, de coloração castanho claro, medindo de 7 a 8 mm de diâmetro (COSTA et al., 2011).

O fruto possui altos conteúdos de vitaminas A, B1, B2 e C, além de fósforo, cálcio e proteínas (BARROS, 2006). São consumidos *in natura* ou utilizados como matéria prima para a fabricação de doces, licores, sucos, geleias, vinhos, compotas e sorvetes, indicando potencial agroindustrial. Pesquisas apontam para o alto teor de vitamina C presentes nos frutos. Em frutos de acessos do BAGMangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Silva et al. (2015) observaram teores de vitamina C entre 226,63 e 244,43 mg.100g⁻¹. Em populações naturais de Sergipe, Silva et al. (2012) observaram valores entre 429 e 479 mg.100g⁻¹. Em frutos oriundos de Picos (PI), Rufino et al. (2009) verificaram teor médio de 431 mg.100g⁻¹ na polpa. Em geral, esses valores podem ser considerados altos, quando comparados com outras frutas ricas em vitamina C, como caju (219 mg.100g⁻¹), morango (71,80 mg.100g⁻¹) e goiaba (218 mg.100g⁻¹) (FREIRE et al., 2013). Além de vitaminas, a polpa dos frutos contém proteínas (1,3 a 3,0%), carboidratos (10,02%), fibras (3,4%), lipídeos (2,3%), ferro, fósforo, cálcio, entre outros nutrientes (ARAÚJO et al., 2004).

Outras partes da planta são utilizadas na medicina popular, como a casca, para combater doenças de pele e como estimulante de funções hepáticas (LIMA; SCARIOT, 2010). Estudos realizados em camundongos evidenciaram que o extrato da casca foi eficiente no combate e cicatrização de úlceras gástricas, devido a sua capacidade de estímulo para a síntese de muco (MORAES et al., 2008). O chá das folhas é usado para o tratamento de cólicas menstruais (SILVA JUNIOR, 2004). Em estudo com látex de mangabeira, Almeida et al. (2014) verificaram a eficiência no processo de cicatrização.

A mangabeira é uma planta de polinização cruzada, autoincompatível, sendo necessária a presença de indivíduos diferentes e de polinizadores específicos para que ocorra a fecundação e a produção de frutos (MOURA et al., 2011). Estes polinizadores pertencem a diferentes grupos taxonômicos, como Shingidae, abelhas (*Euglossini*), Hesperiidae e Nymphalidae (*Heliconius*). Cada espécie de polinizador tem uma demanda ambiental particular, seja como alimento para a prole e adultos, como plantas hospedeiras para lagartas e locais de acasalamento. Em virtude disso, para que haja um incremento na produção é necessário que o cultivo desta planta concentre-se em áreas que possuam fortes populações de polinizadores (DARRAULT; SCHLINDWEIN, 2006).

A propagação da mangabeira é feita por semente, entretanto, devido à recalcitrância, a propagação apresenta entraves. Além disso, substâncias inibidoras contidas na polpa dos frutos podem impedir ou dificultar a germinação (VIEIRA NETO et al., 2009). Com a remoção da polpa dos frutos, as sementes mantidas em condições ambientes tendem a ressecar, e por não suportarem o ressecamento por longo período, devem ser semeadas até um dia após retiradas do fruto (SOUZA et al., 2005). Portanto, a propagação da mangabeira ainda

consiste em um dos principais entraves para o cultivo em grande escala, uma vez que a espécie apresenta germinação lenta e desuniforme.

O cultivo ou produção de mudas comerciais são escassos, sendo o extrativismo a principal forma de exploração. No ano de 2016 a produção extrativista foi de 922 toneladas de mangaba, em 2015, 663 toneladas, havendo um aumento de 39,1%. O estado da Paraíba é responsável pela maior produção (26,68%), seguido por Sergipe (20,60%) e Minas Gerais (17,57%) (IBGE, 2018). Em Sergipe, os frutos comercializados são provenientes de áreas nativas ou áreas de pequenos produtores, nas quais populações tradicionais praticam o extrativismo há muito tempo. Neste cenário, a mangabeira tem uma importância social e econômica para essas populações locais.

2.2 Recursos genéticos

Na região Nordeste, o extrativismo, aliado à exploração imobiliária tem causado acelerada erosão genética nas áreas de ocorrência desta espécie (SANTOS, 2010). No estado de Sergipe, a atividade extrativista da mangabeira é realizada principalmente pelas catadoras de mangaba. O grupo de catadoras de mangaba de Sergipe é formado por mulheres, habitantes das restingas e tabuleiros costeiros, que desempenham o extrativismo em áreas remanescentes de mangabeiras (MOTA et al., 2005).

O Movimento das Catadoras de Mangaba (MCM) de Sergipe foi criado em 2007. Apesar dos desafios o movimento segue tentando manter a atividade e o reconhecimento. O MCM representou um grande avanço para a formação política e identidade de todas as envolvidas (SANTOS; SOUZA, 2016). Essas mulheres também são consideradas como essenciais para a conservação e biodiversidade, pois atuam de forma a desenvolver práticas e saberes que possibilitam a manutenção das áreas nativas, através da produção artesanal de mudas e os cuidados com as plantas durante a colheita e pós-colheita. Esses conhecimentos são passados através de gerações, e contribuem para a conservação dos recursos genéticos presentes em campos nativos (MOTA et al., 2007).

A identificação de áreas com potencial de ocorrência de uma espécie nativa possibilita entender a dinâmica da espécie e a elaboração de estratégias para recuperação de áreas degradadas. A aplicação de ferramentas, como o mapeamento, são fontes de informação para atividades que visam a recuperação destas áreas, escolha de indivíduos em estudos de diversidade genética, como também para seleção de matrizes fornecedoras de sementes (GARRASTAZU; MATTOS, 2013). No mais recente mapeamento sobre a espécie em Sergipe,Rodrigues et al. (2017) relataram como principais causas para o desmatamento de áreas nativas de mangabeira, a expansão dos centros urbanos, o avanço de plantios como cana-de-açúcar e eucalipto e a expansão imobiliária.

Outra abordagem importante é conhecer a diversidade genética existente, pois dependendo das práticas de manejo exercidas pela atividade humana, pode haver uma redução da mesma (CARVALHO et al., 2013). As consequências dessas intervenções na distribuição espacial das espécies podem desencadear processos genéticos que afetam as frequências genéticas das populações, incluindo a oscilação genética e o efeito fundador (GIUSTINA et al., 2014). Portanto, pesquisas que analisam a diversidade genética e a estrutura das populações remanescentes de mangabeira são fundamentais para o estabelecimento de estratégias de conservação de germoplasma e preservação da espécie (AMORIM et al., 2015).

Mecanismos de compreensão da dinâmica populacional em populações naturais de plantas são extremamente importantes para preservar o patrimônio genético, uma vez que estes contêm o conhecimento sobre o comportamento reprodutivo e os efeitos da interferência ambiental nas populações. O fluxo gênico e o grau de diferenciação entre populações obtidas por análises moleculares, comparadas entre e dentro de populações naturais, permitem compreender melhor como ocorre a seleção de acordo com a adaptação em populações isoladas, além de fornecer uma medida para quantificar a variabilidade genética na população como um todo (BEKESSY et al., 2002).

Estudos sobre a variabilidade genética de populações existentes de *H. speciosa* são ainda incipientes. Desta forma, informações sobre a estrutura genética das populações naturais são essenciais para a sua domesticação e melhoria, assim como para a amostragem de bancos de germoplasma (MOURA et al., 2011). Devido à redução da área da Mata Atlântica e do Cerrado, onde ocorre essa espécie, é de extrema importância identificar, coletar, preservar e caracterizar os recursos genéticos disponíveis. Esses recursos serão essenciais para os programas de melhoramento genético, podendo resultar na identificação e seleção de genótipos superiores adaptados a diferentes ecossistemas, que tenham resistência ou tolerância a doenças e pragas, bem como a seleção de variedades com características agronômicas e tecnológicas de interesse para exploração comercial (SILVA JUNIOR; LEDO, 2006).

A conservação de recursos genéticos pode ser feita no local de ocorrência da espécie (*in situ*) ou transportada para outros locais (*ex situ*) onde se realizam a conservação dos acessos. Denomina-se :acessoøa amostra de germoplasma representativa de um indivíduo ou de uma população, diferenciada e identificada de maneira única (SALOMÃO, 2010). Os materiais genéticos ou germoplasmas são unidades físicas vivas contendo a composição genética de um organismo particular, com a habilidade de se reproduzir (BALICK, 1989). É imprescindível o estabelecimento de bancos de germoplasma para conservar espécies, genes e alelos visando à garantia futura de características de interesse econômico, ambiental, social, dentre outras (MAZZOCATO et al., 2014).

No ano de 2006, no estado de Sergipe, foi instalado pela Embrapa Tabuleiros Costeiros, o Banco Ativo de Germoplasma de Mangabeira. O BAG apresenta-se como uma alternativa de preservação da diversidade genética da espécie, tendo em vista que grandes áreas de sua ocorrência natural estão sendo devastadas (SILVA et al., 2017a).

Além do BAG da Embrapa Tabuleiros Costeiros, existem ainda outras coleções, como a pertencente à Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA, criada em 1970, com 125 acessos (BEZERRA et al., 1993); a da Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba - EMEPA-PB, implantada em 1991, com 220 acessos (AGUIAR FILHO et al., 1998; SOUZA et al., 2007); da Embrapa Amapá, de 1998, com 36 progênies nativas do Cerrado amapaense (YOKOMIZO et al., 2017a); a da Universidade Federal de Goiás (EA/UFG), desde 2005, com 191 acessos e 57 progênies de polinização aberta (ALMEIDA, 2015) e a da Universidade Federal de Alagoas, com 40 acessos (ESPÍNDOLA et al., 2003.

A avaliação da diversidade genética entre os acessos de um BAG resulta em informações sobre potenciais genitores a serem utilizados em programas de melhoramento; possibilita a identificação de duplicatas e o intercâmbio de germoplasma entre pesquisadores. É uma forma de conciliar os esforços de conservação da agrobiodiversidade com o desenvolvimento sustentável (NASS, 2007). A caracterização de amostras existentes em um banco de germoplasma possibilita que o máximo da variabilidade genética seja reunida e preservada com o mínimo possível de duplicações, além de promover material genético para realização de programas de melhoramento (MANFIO et al., 2012).

Os BAGs representam um acervo de genes e um reservatório de variabilidade genética natural, potencial indispensável para programas de melhoramento das espécies (COSTA et al., 2011). O valor da variabilidade genética está em sua utilização e somente com a caracterização dos acessos disponíveis pode-se conhecer suficientemente a diversidade genética preservada (COIMBRA et al., 2012). Essa caracterização dos acessos é de fundamental importância para o conhecimento de suas potencialidades, identificando-se a variabilidade entre e dentro das populações (LIMA et al., 2012).

2.3 Propagação da mangabeira

A propagação da mangabeira é realizada principalmente por sementes, entretanto, devido à recalcitrância, este método tradicional de propagação tem sido dificultado (FREIRE et al., 2011), pois sementes deste tipo não suportam dessecação, perdendo rapidamente o

vigor quando retiradas do fruto. Além da recalcitrância, substâncias inibidoras contidas na polpa dos frutos atuam dificultando ou impedindo o processo germinativo, desta forma, a germinação é caracterizada como lenta e desuniforme, sendo este um dos principais obstáculos para a propagação da espécie (DARRAULT; SCHLINDWEIN, 2006). Nestas sementes, a perda de água estrutural durante o processo de secagem pode causar alterações no metabolismo e no sistema de membranas, resultando no início do processo de deterioração (FARRANT et al., 1988).

Nas sementes recalcitrantes há teores de água definidos como críticos, abaixo dos quais a viabilidade é reduzida, também há teores de água letais, relacionados à perda total da viabilidade. Valores entre 27 a 38% para o teor crítico e entre 12 a 22% para o teor letal têm sido reportados (BILIA et al., 1999). Em sementes de mangabeira, Soares et al. (2015) verificaram que a maior porcentagem de germinação foi obtida quando as sementes permaneceram até 34 horas de secagem, à 30°C, a partir deste tempo ocorreu redução na porcentagem de germinação, chegando a 13% no período de 72 horas de secagem. A secagem natural, à 25°C, acima de 48 horas prejudicou a emergência e o crescimento inicial das plântulas de mangabeira (SANTOS et al., 2010).

Entender a propagação da mangabeira torna-se necessário para o incremento do sistema de produção, uma vez que existem materiais com características promissoras para serem incorporadas ao processo produtivo. A realização de estudos envolvendo a germinação, emergência e crescimento de mangabeira têm sido relatados em vários trabalhos, como os de Barros et al. (2010) que estudaram o comportamento germinativo de sementes submetidas à dessecação; Silva et al. (2011) que verificaram a influência de diferentes substratos na produção de mudas; além de Vieira et al. (2013); Pinto et al. (2014) e Vieira et al. (2015). Como a espécie encontra-se em fase de domesticação, existem várias lacunas a serem preenchidas e pesquisas que possibilitem o conhecimento da propagação da mangabeira são necessárias para promover a produção dessa espécie potencial.

2.4 Caracterização biométrica

As análises biométricas fornecem informações importantes no que diz respeito à qualidade dos lotes de sementes, constituindo-se como elementos necessários para a diferenciação de espécies do mesmo gênero (ANDRADE et al., 2010). São ferramentas que identificam características peculiares ao fruto e à semente, fornecendo assim um melhor entendimento da dinâmica produtiva das espécies (GUSMÃO et al., 2006). Também podem ser empregadas nas análises de laboratório, para a identificação e diferenciação de plantas em viveiros e no campo (AMORIM et al., 2008). A falta de informações neste âmbito pode dificultar as pesquisas sobre silvicultura e preservação de espécies ameaçadas de extinção(BARRETO et al., 2011).

A variabilidade fenotípica pode ser bastante influenciada por fatores ambientais e genéticos, desta forma, a biometria apresenta-se como um importante instrumento para detectar diferenças dentro de populações de uma mesma espécie, como também, na definição das relações entre a variabilidade genética e os componentes ambientais (CARVALHO et al., 2003). Para a mangabeira, a variabilidade fenotípica existente é um importante fator para auxiliar na seleção de plantas com maior uniformidade e características específicas ao mercado consumidor (GANGA et al., 2010).

As espécies nativas possuem grande variabilidade quanto às características morfológicas, como tamanho de frutos, quantidade e dimensões das sementes. Alguns estudos biométricos de frutos e sementes de espécies nativas foram realizados em umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) (COSTA et al., 2015); baru (*Dipteryx alata* Vog.) (ZUFFO et al., 2014); pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Cambess) (MOURA et al., 2013); gabiroba (*Campomanesia adamantium*) (DRESCH et al., 2013) e murici (*Byrsonima dealbata* Griseb) (LOURENÇO et al., 2013).

No Nordeste brasileiro, estudos sobre a biometria de mangabeira têm fornecido informações importantes para o conhecimento do desenvolvimento desta espécie (GANGA et al., 2010). Estudos biométricos em frutos e sementes de mangabeira foram realizados por Perfeito et al. (2015), Yokomizo et al. (2017b) e Gonçalves et al. (2013), e enfatizaram que existe grande variabilidade para as características avaliadas em mangabeira.

2.5 Diversidade genética

A diversidade genética consiste em um dos mais importantes parâmetros avaliados por melhoristas de plantas na fase inicial de um programa de melhoramento. Muitos métodos estão disponíveis para avaliá-la, diferenciando-se na habilidade em detectar diferenças entre genótipos (MORALES et al., 2011). O estudo dessa diversidade proporciona a obtenção de informações sobre a estruturação genética de populações e os parâmetros da diversidade, que auxiliam os programas de melhoramento (GOVINDARAJ et al., 2015).

A ampliação do conhecimento sobre o desenvolvimento e a variação genética de espécies nativas é essencial, pois a domesticação e incorporação dessas espécies em sistemas produtivos estão relacionadas às informações da distribuição da variabilidade genética em populações naturais. A caracterização molecular destaca-se como forma de avaliar essa diversidade, permitindo a partir de marcas genéticas, inferir sobre o grau de diversidade entre populações. Portanto, o estudo dos componentes da variabilidade da espécie é fundamental, especialmente para espécies nativas pouco estudadas, cuja magnitude da diversidade ainda não é totalmente conhecida (COSTA et al., 2011).

Uma forma de avaliar a diversidade genética em plantas é por meio de marcadores moleculares, que consistem em ferramentas básicas para o estudo da variabilidade e estrutura genética das populações (RAMALHO et al., 2016). Os marcadores moleculares são sequências identificáveis de DNA encontradas em localizações específicas do genoma e transmitidas pelas leis comuns de herança de uma geração para outra (RODRIGUES, 2013), e podem ser utilizados para diversos fins, como na análise filogenética e diversidade genética (GROVER; SHARMA, 2014). A caracterização de variedades por meio de marcadores moleculares tem sido bastante utilizada, uma vez que análises com marcadores possibilitam a discriminação entre genótipos, mesmo que a base genética entre eles seja estreita (BORÉM; MIRANDA, 2013).

Os marcadores ISSR (Inter simple sequence repeats) e SSR (Simple sequence repeats) ou microssatélites são amplamente utilizados para estudos de diversidade genética de plantas. Os marcadores ISSR são dominantes e por isso não discriminam indivíduos homozigotos de heterozigotos, porém, geram múltiplos fragmentos de DNA sem a necessidade do conhecimento prévio do genoma das espécies. A técnica com este tipo de marcador é considerada de baixo custo, de fácil uso e reprodutível (NG; TAN, 2015). Enquanto que os marcadore SSR são sequências de DNA que variam de 1 a 6 pares de bases repetidas em tandem (PRIYONO; PUTRANTO, 2014). Essas sequências são de grande interesse na genética de populações, devido à sua alta taxa de mutação. As mutações resultam em marcadores polimórficos, permitindo discriminação genética de indivíduos proximamente relacionados, mesmo empregando um número relativamente baixo de marcadores (GOURLAT et al., 2011). São codominantes, reprodutíveis e altamente polimórficos, porém, o uso destes marcadores requer conhecimento preliminar do genoma (JIANG, 2013).

Em mangabeira, estes marcadores tem sido utilizados com sucesso em estudos de populações naturais (SILVA et al., 2017b; SOARES et al., 2016; COSTA et al., 2015; JIMENEZ et al., 2015; LUZ, 2016). Os marcadores SSR foram desenvolvidos por Rodrigues (2015) e publicados pela primeira vez por Amorim et al. (2015).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR FILHO, S.P.; BOSCO, J.; ARAÚJO, I.A. **A mangabeira** (*Hancornia speciosa*) domesticação e técnicas de cultivo. João Pessoa: EMEPA-PB, 1998. 26p.

ALMEIDA, G.Q. Variabilidade morfoagronômica da coleção de germoplasma de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) da Universidade Federal de Goiás. 2015. 105f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, 2015.

ALMEIDA, L.M.; FLORIANO, J.F.; RIBEIRO, T.P.; MAGNO, L.N.; MOTA, L.S.L.S.; PEIXOTO, N.; MRUÉ, F.; MELO-REIS, P.; LINO JÚNIOR, R.S.; GRAEFF, C.F.O.; GONÇALVES, P.J. *Hancornia speciosa* látex for biomedical applications: physical and chemical properties, biocompatibility assessment and angiogenetic activity. **Journal Materials Science: Materials in Medicine**, v.25, n.9, p.2153-2162, 2014.

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

AMORIM, J.A.E.; MATA, L.R.; LÉDO, A.S.; AZEVEDO, V.C.R.; SILVA, A.V.C. Diversity and genetic structure of mangaba remnants in states of northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.14, n.1, p. 823-833, 2015.

AMORIM, I.L.; DAVIDE, A.C.; FERREIRA, R.A.; CHAVES, M.M.F. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e mudas de *Senna multijuga* var. lindleyana (Gardner) H. S. Irwin & Barneby - Leguminosae Caesalpinioideae. **Revista Brasileira de Botânica**, v.31, n.3, p.507-516, 2008.

ANDRADE, L.A.; BRUNO, R.L.A.; OLIVEIRA, L.S.B.; SILVA, H.T.F. Aspectos biométricos de frutos e sementes, grau de umidade e superação de dormência de jatobá. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.32, n.2, p.293-299, 2010.

ARAÚJO, C.L.; BEZERRA, I.W.L.; DANTAS, I.C.; LIMA, T.V.S.; OLIVEIRA, A.S.; MIRANDA, M.R.A.; LEITE, E.L.; SALES, M.P. Biological activity of proteins from pulps of tropical fruits. **Food Chemistry**, v.85, n.1, p.107-110, 2004.

BALICK, M.J. Collecting tropical plant germplasm. In: CAMPBELL, D.G.; HAMMOND, H.D. **Floristic inventory of tropical countries**. New York: The New York Botanical Garden, World Wildlife Fund, 1989. p.476-481.

BARRETTO, S.S.B.; FERREIRA, R.A. Aspectos morfológicos de frutos, sementes, plântulas e mudas de Leguminosae Mimosoideae: *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan e *Enterolobium contortisiliquum* (Vellozo) Morong. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.2, p.223-232, 2011.

BARROS, D.I.; BRUNO, R.L.A.; NUNES, H.V.; MENDONÇA, R.M.N.; PEREIRA, W.E. Physiological behavior of mangaba seeds submitted to desiccation. **Revista Acta Tecnológica**, v.5, n.1, p.32-43, 2010.

BARROS, D.I. **Tecnologia de sementes de mangaba** (*Hancornia speciosa* Gomes). 2006. 89 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB, 2006.

- BEKESSY, S.A; ALLNUTT, T.R; PREMOLI, A.C; LARA, A.; ENNOS, R.A; BURGMAN, M.A.; CORTES, M.; NEWTON, A.C; Genetic variation in the vulnerable and endemic Monkey Puzzle tree, detected using RAPDs. **Heredity**, v.88, n.4, p. 243-249, 2002.
- BEZERRA, J.E.F.; LEDERMAN, I.E.; PEDROSA, A.C.; DANTAS, A.P.; MOURA, R.J.M.; MELO NETO, M.; SOARES, L.M. Conservação *in vivo* de germoplasma de fruteiras tropicais nativas e exóticas em Pernambuco. In: Simpósio Nacional de Recursos Genéticos de Fruteiras Nativas. **Anais...** Cruz das Almas: Embrapa-CNPMF, 1993.
- BILIA, D.A.C.; MARCOS FILHO, J.; NOVEMBRE, A.D.C.L. Desiccation tolerance and seed storability of *Inga uruguensis* (Hook. et Arn.). **Seed Science and Technology**, v.27, n.1, p.77-89, 1999.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. Melhoramento de plantas. Viçosa: UFV, 2013. 523p.
- CARVALHO, S.V.A.; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R.A.; MELO, M.F.V.; SOUZA, D.C. Diversidade genética. In: GOMES, L.J.; SILVA-MANN, R.; MATTOS, P.P.; RABANNI, A.R.C. **Pensando a biodiversidade: aroeira** (*Schinus terebinthifolius* **Raddi.**). São Cristóvão: Editora UFS, 2013. p.89-108.
- CARVALHO, J.E.U.; NAZARÉ, R.F.R.; OLIVEIRA, W.M. Características físicas e físico-químicas de um tipo de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) com rendimento industrial superior. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.2, p.326-328, 2003.
- COIMBRA, R.R.; MIRANDA, G.V.; CRUZ, C.D.; SILVA, D.J.H.; VILELA, R.A. Amostragem de acessos introduzidos e melhorados para composição de uma coleção núcleo de milho. **Revista Ciência Agronômica**, v.43, n.1, p.184-194, 2012.
- COSTA, F.R.; RÊGO, E.R.; RÊGO, M.M.; NEDER, D.G.; SILVA, S.M.; SCHUNEMANN, A.P.P. Análise biométrica de frutos de umbuzeiro do semiárido brasileiro. **Bioscience Journal**, v.31, n.3, p.682-690, 2015.
- COSTA, D.F.; VIEIRA, F.A.; FAJARDO, C.G.; CHAGAS, K.P.T. Diversidade genética e seleção de iniciadores issr em uma população natural de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.3, n.4, p.970-976, 2015.
- COSTA, T.S.; SILVA, A.V.C.; LÉDO, A.S.; SANTOS, A.R.F.; SILVA JÚNIOR, J.F.S. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.46, n.5, p.499-508, 2011.
- DARRAULT, R.O; SCHLINDWEIN, C. Polinização. In: SILVA JUNIOR, J.F.; LEDO, A.S. **A cultura da mangabeira**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. p.43-56.
- DRESCH, D.M.; SCALON, S.P.Q.; MASETTO, T.E.; VIEIRA, M.C. Germinação e vigor de sementes de gabiroba em função do tamanho do fruto e semente. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.43, n.3, p.262-271, 2013.
- ESPÍNDOLA, A.C.M; CARVALHO, N.S.G.; ALMEIDA, C.C.S. Prospecção, coleta e manutenção de germoplasma de mangabeira em Alagoas. In: Simpósio Brasileiro sobre a cultura da mangaba, 2003, Aracaju, SE. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. Disponível em CD-ROM.
- FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Recalcitrance a current assessment. **Seed Science and Technology**, v.16, n.1, p.1555-1566, 1988.

- FREIRE, J.M.; ABREU, C.M.P.; ROCHA, D.A.; CORRÊA, A.D.; MARQUES, N.R. Quantificação de compostos fenólicos e ácido ascórbico em frutos e polpas congeladas de acerola, caju, goiaba e morango. **Ciência Rural**, v.43, n.12, p.2291-2295, 2013.
- FREIRE, K.C.S.; COELHO, G.G.; RUSSO, S.L.; SILVA, A.V.C.; LÉDO, A.S.; SÁ, A.J.; MACHADO, C.A. Germinação in vitro de embriões zigóticos e aclimatação de plântulas de mangaba oriundas da cultura de embrião (*Hancornia speciosa* Gomes). **Scientia Plena**, v.7, n.11, 2011.
- GANGA, R.M.D.; FERREIRA, G.A.; CHAVES, L.J.; NAVES, R.V.; NASCIMENTO, J.L. Caracterização de frutos e árvores de populações naturais de *Hancornia speciosa* Gomes do Cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, n.1, p.111-113, 2010.
- GARRASTAZU, M.C.; MATTOS, P.P. Modelagem e distribuição geográfica. In: GOMES, L.J.; SILVA-MANN, R.; MATTOS, P.P.; RABANNI, A.R.C. **Pensando a biodiversidade: aroeira** (*Schinus terebinthifolius* **Raddi.**). São Cristóvão: Editora UFS, 2013. p.21-42.
- GIUSTINA, L.D.; LUZ, L.N.; VIEIRA, F.S.; ROSSI, F.S.; SOARES-LOPES, C.R.A.; PEREIRA, T.N.S.; ROSSI, A.A.B. Population structure and genetic diversity in natural populations of *Theobroma speciosum* Willd. Ex Spreng (Malvaceae). **Genetic and Molecular Research**, v.13, n.2, p.3510-3519, 2014.
- GONÇALVES, L.G.V.; ANDRADE, F.R.; MARIMON JUNIOR, B.H.; SCHOSSLER, T.R.; LENZA, E.; MARIMON, B.S. Biometria de frutos e sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) em vegetação natural na região leste de Mato Grosso, Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, v.36, n.1, p.36-40, 2013.
- GOURLAR, I.C.G.R.; MEROTTO JUNIOR, A.; NUNES, A.L.; BERED, F. Otimização da utilização de marcadores moleculares microssatélites e sua aplicação em estudos com plantas daninhas. **Planta Daninha**, v.29, Número Especial, p.1175-1181, 2011.
- GOVINDARAJ, M.; VETRIVENTHAN, M.; SRINIVASAN, M. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. **Genetics Research International**, p. 1-14, 2015.
- GROVER, A.; SHARMA, P. C. Development and use of molecular markers: past and present. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.36, n.2, p. 1-13, 2014.
- GUSMÃO, E.; VIEIRA, F.A.; FONSECA JÚNIOR, E.M. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.). **Cerne**, v.12, n.1, p.84-91, 2006.
- IBGE ó Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da extração vegetal e da silvicultura PEVS 2018**. Disponível em: <a href="https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/2040-np-producao-da-extracao-vegetal-e-da silvicultura.html?=resultados. Acesso em: 13 jan. 2018.
- JIANG, G.L. Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. In: ANDERSEN, S.B. **Plant Breeding from Laboratories to Fields**. InTech, 2013. p.45-83.
- JIMENEZ, H.J.; MONTARROYOS, A.V.V. MARTINS, L.S.S. MORAES FILHO, R.M. Genetic diversity of the Neotropical tree *Hancornia speciosa* Gomes in natural populations in Northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.14, n.4, p.17749-17757, 2015.

- LIMA, I.L.P.; SCARIOT, J.E.F. **Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável da Mangaba**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 68p.
- LIMA, M.S.; CARNEIRO, J.E.S.; CARNEIRO, P.C.S.; PEREIRA, C.S.; VIEIRA, R.F.; CECON, P.R. Characterization of genetic variability among common bean genotypes by morphological descriptors. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.12, n.1, p.76-84, 2012.
- LOURENÇO, I.P.; FIGUEIREDO, R.W.; ALVES, R.E.; ARAGÃO, F.A.S.; MOURA, C.F.H. Caracterização de frutos de genótipos de muricizeiros cultivados no litoral cearense. **Revista Ciência Agronômica**, v.44, n.3, p.499-504, 2013.
- LUZ, G.A. Diversidade genética em acessos de mangaba do banco de germoplasma da Embrapa Meio-Norte. 2016. 56f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI, 2016.
- MANFIO, C.E.; MOTOIKE, S.Y.; RESENDE, M.D.V.; SANTOS, C.E.M.; SATO, A.Y. Avaliação de progênies de macaúba na fase juvenil e estimativas de parâmetros genéticos e diversidade genética. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.32, n.69, p.63-68, 2012.
- MAZZOCATO, A.C.; FERREIRA, J.L.; KÖPP, M.M.; MONTARDO, D.P. Conservação e uso no BAG (Banco Ativo de Germoplasma) de forrageiras do sul. In: XV Encontro de Botânicos do Rio Grande do Sul 2014, **Anais...** Campos Carreiros: Centro Integrado de Desenvolvimento do Ecossistema Costeiro do Extremo Sul local.
- MORAES, T.M.; RODRIGUES, C.M.; KUSHIMA, H.; BAUAB, T.M.; PELLIZZON, C.H.; BRITO, A.R.M.S.; HIRUMA-LIMA, C.A. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Heliobacter pilori* actions. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, n.2, p.161-168, 2008.
- MORALES, R.G.F.; RESENDE, J.T.V.; FARIA, M.V.; SILVA, P.R.; FIGUEIREDO, A.S.T.; CARMINATTI, R. Divergência genética em cultivares de morangueiro, baseada em caracteres morfoagronômicos. **Revista Ceres**, v.58, n.3, p.323-329, 2011.
- MOTA, D.M.; SCHMITZ, H.; SILVA JUNIOR, J.F.; JESUS, N.B.; PEREIRA, E.O.; RODRIGUES, R.F.A.; SANTOS, J.V.; CURADO, F.F. **As Catadoras de Mangaba: Problemas e Reivindicações.** Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2007. 74p.
- 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. **Anais**... Ribeirão Preto: SOBER, 2005.
- MOURA, F.N.; CHAVES, L.J.; NAVES, R.V. caracterização física de frutos de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) do cerrado. **Revista Árvore**, v.37, n.5, p.905-912, 2013.
- MOURA, N.F.; CHAVES, L.J.; VENKOVSKY, R.; NAVES, R.V.; AGUIAR, A.V.; MOURA, M.F.; Genetic structure of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) populations in the cerrado region of central Brazil. **Bioscience Journal**, v.27, n.3, p.473-481, 2011.
- NASS, L.L. **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 858p.

- NG, W.L.; TAN, S.G. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: are we doing it right? **ASM Science Journal**, v.9, n.1, p.30-39, 2015.
- PERFEITO, D.G.A.; CARVALHO, N.; LOPES, C.M.L.; SCHMIDT, F.L. Caracterização de frutos de mangabas (*Hancornia speciosa* Gomes) e estudo de processos de extração da polpa. **Revista de Agricultura Neotropical**, v.2, n.3, p.1-7, 2015.
- PINTO, R.J.; MAPELI, N.C.; CREMON, C.; SILVA, E.F. Germinação e crescimento inicial de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) em função de preparados homeopáticos *Carbo vegetabilis* e dias após o despolpamento para semeadura. **Revista Agrarian**, v.7, n.24, p.244-250, 2014.
- PRIYONO; PUTRANTO, R.A. Molecular markers and their application for DNA fingerprinting and genetic diversity studies in Coffea species. **Menara Perkebunan**, v.82, n.1, p.39-50, 2014.
- RAMALHO, A.B.; ROSSI, A.A.B.; DARDENGO, J.F.E.; ZORTÉA, K.E.M., TIAGO, A.V.; MARTINS, K.C. Diversidade genética entre genótipos de *Bertholletia excelsa* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Floresta**, v.46, n.2, p.207-214, 2016.
- RODRIGUES, R.F.A.; SILVA JUNIOR, J.F.; MOTA, D.M.; PEREIRA, E.O.; SCHMITZ, H. Mapa do extrativismo da mangaba em Sergipe: situação atual e perspectivas. Brasília, DF: Embrapa, 2017. 55p.
- RODRIGUES, A.J.L.; YAMAGUISHI, A.T.; CHAVES, L.J.; COELHO, A.S.G.; LIMA, J.S.; TELLES, M.P.C. Development of microsatellite markers for *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). **Genetics and Molecular Research**, v.14, n.3, p.7274-7278, 2015.
- RODRIGUES, M.B. Variabilidade genética de populações de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne e *Dypteryx alata* Vogel em áreas nativas e em plantios de recuperação de áreas degradadas em Paracatu, MG. 2013. 127f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2013.
- RUFINO, M.S.M.; FERNANDES, F.A.N.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S. Free Radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. **Food Chemistry**, v.114, n.2, p.693-695, 2009.
- SALOMÃO, A.N. **Manual de curadores de germoplasma Vegetal**: Glossário. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 326p.
- SANTOS, E.A.; SOUZA, R.M. Territorialidade das catadoras de mangaba no litoral sul de Sergipe. **Geosaberes**, v.6, n.3, p.629-642, 2016.
- SANTOS, P.C.G.; ALVES, E.U.; GUEDES, R.S.; SILVA, K.B.; CARDOSO, E.A.; LIMA, C.R. Qualidade de sementes de *Hancornia speciosa* Gomes em função do tempo de secagem. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.2, p.343-352, 2010.
- SILVA, A.V.C.; AMORIM, J.A.E.; MELO, M.F.V.; LEDO, A.S.; RABBANI, A.R.C. Genetic Diversity of Remaining Populations of Mangaba (Hancornia speciosa Gomes) in Restingas of Brazil. **Journal of Agricultural Science**, v.9, n.2, p.46-52, 2017b.
- SILVA, A.V.C.; SOARES, A.N.R.S, LEDO, A.S.; COSTA, T.S.; ALMEIDA, C.S.; AMORIM, J.A.E.; SANTOS, P.S.; VITÓRIA, M.F. Uses and technological prospects for the

- mangaba, a native fruit of Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v.16, n.7, p.302-311, 2017a.
- SILVA A.V.C,; SILVA JÚNIOR, J.F.; FARLEY, C.; MOURA, H.; LÉDO, A.S.; MENEZES, D.N.B.; VITÓRIA, M.F.; AMORIM, J.A.E. Atributos de Qualidade e Funcionais de Acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros. **Circular Técnica**, n.71, p.1-7, 2015.
- SILVA, S.A.; CRUZ, E.M.O.; REIS, R. V.; FERREIRA, C.F.; PASSOS, A.R. Caracterização morfológica e molecular de genótipos de mangaba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, n.4, p.1093-1100, 2013.
- SILVA, A.V.C.; LEDO, A.S.; MUNIZ, E.N.; SANTOS, J.S.; FEITOSA, R.B.; ALMEIDA, C.S. Postharvest characterization of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) from natural populations in Sergipe, Brazil. **Acta Horticulturae**, v.945, edição especial, p.263-266, 2012.
- SILVA, E.A.; OLIVEIRA, A.C.; MENDONÇA, V.; SOARES, F.M. Substratos na produção de mudas de mangabeira em tubetes. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.41, n.2, p.279-285, 2011.
- SILVA JUNIOR, J.F.; LÉDO, A.S. Botânica. In: SILVA JUNIOR, J.F.; LÉDO, A.S. (Ed.). A cultura da mangaba. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. p. 25-33.
- SILVA JUNIOR, J.F. A cultura da mangaba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.1, p. 1-19, 2004.
- SOARES, A.N.R., VITÓRIA, M.F., NASCIMENTO, A.L.S., LÉDO, A.S., RABBANI, A.R. C.; SILVA, A.V.C. Genetic diversity in natural populations of mangaba in Sergipe, the largest producer State in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.15, n.3, p.1-12, 2016.
- SOARES, A.N.R.S.; MELO, M.F.V.; VITÓRIA, M.F.; SILVA, A.V.C. Physiological quality of mangaba seeds submitted to drying. **African Journal of Agricultural Research**, v.10, n.52, p.4806-4813, 2015.
- SOARES, F.C.P.; PAIVA, R.; CRAVO, N.R.; OLIVEIRA, L.M.; SILVA, D.R.G.; PAIVA, P.D.O. Cultura da mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). **Boletim Agropecuário**, n.67, p. 1-12, 2006.
- SOUZA, F.G.; FIGUEIREDO, R.W.; ALVES, R.E.; MAIA, G.A.; ARAÚJO, I.A.O. Qualidade Pós-colheita de frutos de diferentes clones de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.5, p.1449-1454, 2007.
- SOUZA, C.S.; SILVA, S.A.; COSTA, M.A.P.C.; DANTAS, A.C.V.L.; FONSECA, A. A.; COSTA, C.A.L.C.; ALMEIDA, W.A.B.; PEIXOTO, C.P. Mangaba: perspectivas e potencialidades. **Revista Bahia Agrícola**, v.7, n.1, p.29-31, 2005.
- VIEIRA, M.C.; NAVES, R.V.; SOUZA, E.R.B.; SILVA, G.D.; BELO, A.P.M.; CAMILO, Y.M.V. Emergência de plântulas de mangabeira provenientes de frutos coletados em diferentes localidades do estado de Goiás. **Comunicata Scientiae**, v.6, n.1, p.33-40, 2015.
- VIEIRA, C.M.; SOUZA, E.R.B.; BELO, A.P.M.; CAMILO, Y.M.V. Desenvolvimento de mudas de mangabeira provenientes de frutos de diferentes localidades do estado de Goiás. **Revista de Ciências Agrárias**, v.36, n.3, p.363-371, 2013.

VIEIRA NETO, R.D.; SILVA JUNIOR, J.F.; LÉDO, A.S. Mangaba. In: SANTOS-SEREJO, J.A.; DANTAS, J.L.L.; COELHO, C.V.S.; COELHO, Y.S. **Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p.323-338.

YOKOMIZO, G.K.I.; SANTOS, I.C.; FREITAS, A.C. Comparação de características produtivas entre progênies de meios irmãos de mangabeiras de populações do Amapá e da Paraíba. **Revista Agro@mbiente On-line**, v.11, n.1, p.63-70, 2017a.

YOKOMIZO, G.K.I.; MAIA, M.C.C.; TRINDADE, C.F. Morphological dissimilarity among mangabeira tree populations from amapá and Paraíba, Brazil. **Revista Caatinga**, v.30, n.2, p.521-529, 2017b.

ZUFFO, A.M.; ANDRADE, F.R.; ZUFFO JUNIOR, J.M. Caracterização biométrica de frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.) na região leste de Mato Grosso, Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, v.37, n.4, p.463-471, 2014.

4. ARTIGO 1 BIOMETRIA, EMERGÊNCIA E CRESCIMENTO INICIAL DE ACESSOS E PROGÊNIES DE MANGABEIRA

Periódico submetido: Plant Species Biology

RESUMO

A mangabeira (Hancornia speciosa Gomes) é uma frutífera nativa, de grande importância, econômica, cultural e ambiental em suas áreas de ocorrência. Esta espécie é propagada por sementes e as mesmas são classificadas como recalcitrantes. A propagação ainda é um dos principais obstáculos para a implantação de pomares comerciais, devido a germinação lenta e desuniforme, sendo necessários estudos que possibilitem conhecer melhor a dinâmica de propagação da espécie. O objetivo do trabalho foi avaliar a biometria, a emergência e o crescimento inicial de acessos e progênies de mangabeira. O material vegetal foi oriundo do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado em Itaporanga døAjuda, SE, Brasil. Os tratamentos consistiram em progênies provenientes de 17 acessos. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 25 sementes. Avaliou-se: o peso (g), comprimento (mm), largura (mm) e espessura (mm) dos frutos e sementes dos acessos e o número de sementes por frutos. Para a emergência e crescimento inicial avaliou-se: a porcentagem de emergência (PE%), índice de velocidade de emergência (IVE), a porcentagem de sobrevivência (S%), a altura (ALT), o diâmetro do caule (DC) e o número de folhas (NF). As análises biométricas de frutos e sementes revelaram que há significativa variabilidade fenotípica entre os acessos de mangaba. As progênies dos acessos LGP1, LGP3, LGP4, PTP4, TCP2, TCP6, ABP1, ABP2, ABP4 e BIP4 obtiveram melhores desempenho para todas as variáveis de emergência e crescimento inicial. As progênies dos acessos TCP1, BIP4, CAP5 e PRP5 expressaram menores percentuais de emergência e sobrevivência, além de baixo vigor. O Acesso CAP5 foi inferior aos demais em todas as variáveis de emergência e crescimento, não sendo promissor para o estabelecimento de plântulas no campo.

Palavras-chave: Hancornia speciosa Gomes, sementes, propagação.

ABSTRACT

Biometry, emergence and initial growth of accessions and mangabeira progenies

The mangabeira (Hancornia speciosa Gomes) is a native fruit of great importance, with it being economic, cultural and environmental, in all of its areas of occurrence. This species is propagated by seeds and these seeds are classified as recalcitrant. Their propagation is still one of the main obstacles for commercial orchard implantation, due to its slow and uneven germination. There is a great necessity for studies that will allow for a better understanding of the propagation dynamics regarding this species. The objective of this study was to evaluate the biometry, the emergence, the initial growth of the accessions, as well as the progenies of this mangabeira fruit tree. This research work has aimed at evaluating the biometrics of the accessions and the emergence and the initial growth of the mangaba progenies (Hancornia speciosa Gomes). The plant material was derived from the Mangaba Genebank of the Embrapa Coastal Tablelands, which is located in Itaporanga, SE, Brazil. The treatments consisted of the progenies from 17 accessions. The experiments were carried out in a completely randomized design with four replications of 25 seeds. The weight (g), length (mm), width (mm) and the thickness (mm) of the fruits and seeds of the accessions, as well as the number of seeds per fruit, were all evaluated. For the emergence and the initial growth, the following attributes were evaluated: the percentages of emergence (PE%), the emergence speed indices (ESI%), their percentages of survival (PS%), their height (H), their stem diameters (SD), as well as the number of leaves (NL). Biometric analyzes of the fruits and seeds revealed that there were significant phenotypic variabilities among the mangaba accessions. The progenies of LGP1, LGP3, LGP4, PTP4, TCP2, TCP6, ABP1, ABP2, ABP4 and BIP4 showed better results for all of the emergence and initial growth variables. The TCP1, BIP4, CAP5 and PRP5 progenies of accession expressed lower degrees of emergence and survival percentages, while also expressing a low vigor. The accession of CAP5 was inferior to the other progenies in all of the emergence and growth variables. This was not promising for its establishment of field seedlings.

Keywords: Hancornia speciosa Gomes, seeds, genetic diversity

4.1. Introdução

Pertencente à família Apocynaceae, a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma frutífera nativa do Brasil, encontrada em regiões de Tabuleiros Costeiros, Baixada Litorânea e no Bioma Cerrado. Devido ao apreciado sabor do fruto e a sua variada utilização como matéria-prima para a fabricação de diversos subprodutos como geleia, sorvete, suco, doce, compotas, vinho e vinagre (Costa et al., 2011), esta espécie tem despertado bastante interesse na indústria de alimentos.

Apesar do potencial agroindustrial, o extrativismo consiste como a única forma de exploração, e aliado à pressão imobiliária, tem causado a diminuição de áreas de ocorrência natural. Devido à redução de remanescentes, foi criado o banco ativo de germoplasma de mangabeira, como medida de conservação da espécie (Nascimento et al., 2017).

O BAGMangaba foi implantado em 2006 pela Embrapa Tabuleiros Costeiros, no Campo Experimental de Itaporanga døAjuda - SE, em uma área de restinga. Atualmente possui 271 acessos, propagados por sementes de polinização aberta, procedentes dos estados da Bahia, Paraíba, Sergipe, Pernambuco, Alagoas, Ceará, Pará e Minas Gerais. A caracterização dos acessos é de fundamental importância, pois possibilita conhecer e preservar a variabilidade existente entre eles, além de selecionar acessos de interesse que poderão originar cultivares superiores por meio de programas de melhoramento genético (Blank, 2013). Além disso, as informações sobre os aspectos relacionados à propagação é imprescindível e deve anteceder a implantação de pomares.

Geralmente propagada por via sexuada, a mangabeira possui sementes recalcitrantes e substâncias inibidoras contidas na polpa, que podem impedir ou dificultar a germinação (Vieira Neto et al., 2009), contribuindo para que a taxa de germinação e o crescimento de mudas sejam lentos e desuniformes. Assim, a propagação consiste em um dos principais gargalos para a produção de mudas em larga escala da espécie.

A qualidade fisiológica de sementes é influenciada pelo genótipo, e o potencial máximo de qualidade das sementes, como germinação e vigor, é controlado geneticamente (Prete & Guerra, 1999). Sendo assim, pesquisas que envolvem a divergência e as relações genéticas para os caracteres relacionados à qualidade fisiológica visam apoiar estratégias de seleção para a melhoria da qualidade fisiológica de sementes (Cardoso et al., 2009). O estudo de tecnologia de sementes florestais nativas é ponto de partida para obtenção de mudas em quantidade e qualidade que possam atender aos diversos segmentos do setor florestal, principalmente por meio de testes de germinação, que possibilitam segurança no comércio de sementes com um padrão mínimo aceitável de qualidade.

Os programas de melhoramento de plantas são normalmente direcionados para a obtenção de cultivares de elevado padrão. Desta forma, pesquisas na área de sementes, por meio de testes fisiológicos, podem ser o ponto de partida para a obtenção de mudas de alta qualidade (Leão et al., 2015), como também, para a seleção de genótipos com alto potencial para a produção de sementes (Moura, 2011). Análises de crescimento também podem ser utilizadas como ferramenta para descrever as condições morfofisiológicas da planta, diferenças fenotípicas, os efeitos dos fenômenos ecológicos sobre o crescimento e a adaptabilidade das espécies em diferentes ecossistemas (Magalhães, 1986).

Outra ferramenta relevante para detectar a variabilidade em populações de uma mesma espécie e as relações com os fatores ambientais é a biometria (Gonçalves et al., 2013). Estudos biométricos fornecem informações quanto às estruturas presentes em frutos e sementes, podendo auxiliar na identificação de espécies (Diniz et al., 2015). Apesar da importância econômica, social e ambiental da mangabeira, estudos envolvendo a biometria de frutos e sementes ainda são incipientes, sendo necessárias pesquisas para que se possam aumentar o conteúdo de informações.

Entender o desenvolvimento é importante para o surgimento de estratégias de manejo para a mangabeira em sua região de origem, tendo em vista que existem recursos genéticos

com características potenciais para serem incorporadas ao processo produtivo (Vieira et al., 2013). Apesar da reconhecida importância e ampla utilização da espécie, ainda existe uma carência de informações sobre os diversos aspectos que envolvem a propagação da mangabeira, e ainda não há na literatura relatos sobre estudos biométricos de sementes e de crescimento inicial de acessos e progênies do BAGMangaba, sendo a presente pesquisa o primeiro trabalho neste âmbito.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a biometria, a emergência e o crescimento inicial de progênies do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Material vegetal

O material vegetal utilizado foi oriundo de 17 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no Campo Experimental de Itaporanga døAjuda, Sergipe, Brasil (11°06'40"S e 37°11'15"W) (Tabela 1). A colheita ocorreu em junho de 2014, no qual foram colhidos 25 frutos por planta de cada acesso estudado. Em seguida, foram encaminhados ao Laboratório de Análise de Sementes da Embrapa Tabuleiros Costeiros, onde realizou-se as análises biométricas e o beneficiamento de sementes.

4.2.2. Biometria de frutos e sementes

Foram avaliados 25 frutos por planta de cada acesso estudado (Figura 1A-B), selecionados quanto à integridade visual e fitossanitária. Avaliou-se:

Peso do fruto: em balança analítica, expresso em g;

Diâmetro, largura e espessura do fruto: com a utilização de paquímetro digital, expresso em mm:

Número de sementes por fruto: através de contagem;

Peso de sementes: realizada em balança analítica onde foi mensurado o peso fresco das mesmas, expresso em g;

Diâmetro, largura e espessura da semente: mensurado com o auxílio de paquímetro digital, expresso em mm.

Foi realizada análise descritiva dos resultados. Os agrupamentos foram representados por meio da Análise de Componentes Principais (PCA) do pacote FactoMineR (Husson et al., 2008). Para a matriz de correlação, foram utilizados os coeficientes de correlação de Pearson. A significância dos mesmos foi avaliada pelo teste t, em vível de 5% de probabilidade. As análises foram realizadas utilizando o *software* R versão 3.3.3 (R Core Team, 2017).

4.2.3. Emergência e crescimento inicial

A produção de mudas (progênies) ocorreu via semente. A semeadura foi realizada em sacos de polietileno (16 x 24 cm), contendo areia lavada como substrato, e os tratamentos consistiram nos diferentes acessos (Tabela 1). As mudas permaneceram em casa de vegetação durante todo o período de avaliação (8 meses) (Figura 2A-C), para a realização dos testes e determinações descritos a seguir:

Emergência: o teste de emergência foi realizado conforme recomendações das Regras para Análises de Sementes-RAS (Brasil, 2009). As contagens tiveram início no 15° dia após a semeadura e a porcentagem de emergência foi efetuada no 55° após a semeadura, considerando como plântulas normais aquelas com todas as suas estruturas essenciais bem desenvolvidas;

Índice de velocidade de emergência (IVE): foi realizado simultaneamente ao teste de emergência, com contagens diárias, a partir do décimo quinto dia, seguido até o final do teste. Esse índice foi calculado de acordo com a fórmula IVE= E1/N1+E2/N2++... En/Nn, onde

IVE= índice de velocidade de emergência; E1, E2 e En = número de plântulas normais, computadas na primeira, segunda... até a última contagem, respectivamente; N1, N2, Nn = número de dias de semeadura à primeira, segunda... até a última contagem, respectivamente (Maguire, 1962);

O desenvolvimento das mudas foi acompanhado durante oito meses, e analisou-se as seguintes variáveis:

Altura de muda: a altura foi mensurada com o auxílio de uma régua graduada em centímetros, medindo-se da base ao ápice do caule;

Diâmetro do caule: semelhante à variável descrita anteriormente, foi determinado por meio de um paquímetro digital;

Número de folhas: foi computado mensalmente pela da contagem do número de folhas por planta;

Porcentagem de sobrevivência: ao final do experimento (8 meses) foi calculada a quantidade de mudas sobreviventes, e os resultados expressos em porcentagem.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 17 tratamentos e quatro repetições de 25 sementes, totalizando 100 sementes por tratamento. Os dados obtidos das variáveis mensuradas para emergência e crescimento inicial do experimento foram submetidos à análise de variância e ao teste de médias de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o *software* Statistical Analysis System (SAS) versão 9.1, (SAS Institute, 2011).

4.3. Resultados

4.3.1. Biometria de frutos e sementes

Houve considerável assimetria entre as matrizes dos acessos (Figura 3). O peso dos frutos (Figura 3A) variou entre 11 e 38 g; o comprimento, largura e espessura (Figuras 3B-D) variaram de 22 a 43 mm; 21 a 41 mm e 12 a 38 mm, respectivamente. O número de sementes por fruto variou de 3 a 32 sementes (Figura 3-E). Para estas características, com exceção do comprimento, se destacaram os acessos ABP4 e TCP6. O acesso CAP5 foi inferior em todas as características avaliadas.

As características biométricas das sementes expressaram significativa variação. O acesso LGP1 obteve o maior peso (2,3 g) de sementes, seguido do acesso BIP2, com 2,2 g (Figura 4A). Para as dimensões de comprimento, largura e espessura, verificou-se que os acessos BIP2 e CAP5 alcançaram maiores valores, variando entre 6 a 9 mm, 6 a 7 mm e 3,3 a 3,1 mm, respectivamente (Figuras 4B-D). Para o número de sementes por frutos, estes mesmos acessos obtiveram valores menores quando comparados àqueles com resultados superiores. No entanto, as sementes dos acessos BIP2 e CAP5 foram maiores em suas dimensões do que as provenientes de frutos com maiores quantidades de sementes.

A Análise de Componentes Principais (PCA) (Figura 5) revelou a existência de dois grupos. Os acessos CAP5 e PRP5 foram os mais isolados, e os dois primeiros componentes principais obtiveram soma de variação de 70,21%.

Pela correlação de Pearson (Tabela 2) constatou-se positiva e elevada correlação entre a largura e espessura do fruto. O tamanho do fruto (comprimento, largura, espessura) e o peso do fruto também se correlacionaram positivamente. O peso do fruto se correlacionou positivamente com o peso das sementes e com o número de sementes por fruto.

4.3.2. Emergência e Crescimento inicial

Houve diferença significativa para a porcentagem de emergência, índice de velocidade de emergência e porcentagem de sobrevivência (Tabela 3). As progênies de acessos provenientes dos estados da Bahia (LGP1, LGP3 e LGP4), Sergipe (PTP4, PTP5, TCP2 e TCP6) e Pará (ABP1 e ABP2) obtiveram os maiores percentuais de emergência.

O vigor das plantas verificado através do IVE foi melhor expresso em progênies dos acessos LGP1, LGP3, LGP4, PTP2, PTP4, TCP2, ABP1 e ABP2. Com relação à taxa de sobrevivência, as progênies dos acessos PTP2, TCP1, BIP4, CAP5 e PRP5 foram inferiores aos demais. Em geral, os acessos com melhores porcentagens de emergência também foram os mais vigorosos, sugerindo uma correlação entre a porcentagem de emergência e o IVE, e um indicador para seleção de progênies que se estabeleçam mais rapidamente.

Observou-se um crescimento contínuo ao longo das avaliações e variações significativas entre as progênies quanto às características analisadas (Tabela 3). As progênies do acesso ABP4 obtiveram maior altura (45,10 cm); as dos acessos ABP4 e BIP4, maior diâmetro de caule (4,43 mm) e as dos acessos TCP6 e BIP4, maior quantidade de folhas. Para todas as variáveis de crescimento inicial, as progênies dos acessos CAP5 alcançaram os menores valores, sendo inferiores às demais.

4.4. Discussão

4.4.1. Biometria de frutos e sementes

Os resultados verificados para a biometria dos frutos podem estar ligados a não domesticação da mangabeira, o que implica que os caracteres a serem levados em consideração para o melhoramento genético ainda não foram bem esclarecidos (Ganga et al., 2010). Contudo, frutos de maior tamanho e peso são geralmente mais apreciados para a comercialização, devido ao maior rendimento da polpa.

A assimetria existente pode ser um indicativo de alta variabilidade genética entre plantas. Entretanto, os caracteres biométricos são bastante variáveis em função das condições ambientais, ou seja, a interação genótipo/ambiente pode ser responsável por causar a variação fenotípica (Barros & Souza Júnior, 2009). A grande variação nos caracteres fenotípicos, associada à variabilidade genética, é típica em espécies alógamas, principalmente nas não domesticadas, isso pode favorecer a seleção de caracteres em programas de melhoramento (Farias Neto et al., 2004).

Estudos de biometria em mangabeira revelaram amplitude de 7,6 a 126 g para a massa dos frutos (Vieira et al., 2017). Zuffo et al. (2014) ao avaliarem as características biométricas do baru (*Dipteryx alata* Vog.), também observaram variações para as características de comprimento (57,78 a 62,16 mm), largura (41,10 a 43,08 mm) e espessura dos frutos (29,95 a 33,55 mm). Resultados semelhantes foram observados por Gonçalves et al. (2013) em estudo feito com biometria de frutos e sementes de mangabeira, em que 33% dos frutos analisados possuíam acima de 25 sementes por fruto. Esta característica é importante para a propagação desta espécie, levando-se em consideração a recalcitrância das sementes (Vieira Neto, 2002). Os resultados para o peso de sementes obtidos neste trabalho foram inferiores aos de Vieira et al. (2017) e Nascimento et al. (2014) em estudos com caracterização biométrica de frutos de mangabeira. Estes autores verificaram uma média de 3,7 g e 2,40 g, respectivamente, para o peso de sementes por fruto.

Muitas espécies podem variar quanto ao tamanho das sementes encontradas em uma mesma árvore. Enquanto que, em outras, as sementes desenvolvem-se com tamanhos similares, alterando apenas o número de sementes (Vaughton & Ramsey, 1998). Não houve relação direta entre a emergência e o tamanho das sementes, tendo em vista que os acessos que expressaram maiores percentuais de emergência obtiveram sementes menores. Apesar das sementes maiores estarem relacionadas às altas taxas de emergência, pode-se afirmar que o acesso CAP5 não oferece perspectivas de êxito para o estabelecimento de plântulas no ambiente, pois, apesar do maior tamanho de sementes, este acesso expressou resultados inferiores quanto à emergência e vigor.

Neste caso, o que mais influenciou foi a informação genética de cada acesso, já que as progênies foram cultivadas em condições ambientais iguais. Isto reforça a hipótese que as matrizes possuem variabilidade genética, confirmando que dentro de uma mesma espécie

podem ocorrer alterações diferentes em cada indivíduo. Assim, variações fenotípicas de frutos e sementes podem acontecer pelo fato de serem procedentes de diferentes matrizes ou plantamãe (Villachica, 1996).

Estudos envolvendo a biometria de frutos e sementes são importantes para a formação de coleções de germoplasmas, assim como para o melhoramento das características desejáveis, seja no sentido de aumento ou uniformidade, possibilitando o direcionamento para programas de melhoramento que possam propiciar cultivares para produção de frutos que atendam as exigências do mercado (Gonçalves et al., 2013) ou da indústria.

A associação entre características é importante, pois permite analisar o grau de influência de um caractere sobre outro, como também realizar a seleção direta (Zuffo et al., 2016). O estudo envolvendo análises multivariadas permite que seja estimada a diversidade entre acessos, como também o conhecimento do germoplasma disponível, contribuindo para que haja uma melhor seleção de acessos, eliminando os mais próximos e permitindo a escolha de atributos desejáveis para serem utilizados na caracterização (Mariot & Barbieiri, 2010). Este tipo de análise é uma ferramenta importante para caracterizar germoplasmas, principalmente por permitir agrupar um conjunto de acessos, tendo como base várias características existentes (Rojas et al., 2003).

Para as correlações observadas, os resultados indicam que frutos mais pesados são relacionados a um maior número de sementes, fato que está diretamente ligado a polinizações eficientes (Ganga et al., 2010). Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Gonçalves et al. (2013) e Nascimento et al. (2014), em estudos com variáveis biométricas de frutos e sementes de mangabeira. Não houve correlação positiva entre as variáveis de tamanho das sementes (comprimento, largura e espessura) e tamanho dos frutos.

Os resultados deste estudo evidenciaram elevados níveis de variabilidade fenotípica para frutos e sementes de acessos de mangabeira, sendo necessário o aprofundamento para identificar características importantes para a produção de frutos e genótipos de interesse comercial.

4.4.2. Emergência e Crescimento inicial

Em programas de melhoramento genético, fatores como emergência e vigor das plantas constituem-se como caracteres alvos (Oliveira et al., 2013). Assim, os atributos genéticos das sementes possuem considerável importância, uma vez que as mudas originadas a partir delas certamente irão refletir na sua capacidade em formar indivíduos superiores (Vechiato & Parisi, 2013). A contribuição relativa de cada caráter para a variabilidade genética é essencial para selecionar caracteres de maior interesse, assim como, descartar aqueles que pouco contribuem para a diferenciação de genótipos (Correa & Gonçalves, 2012).

A determinação de procedimentos adequados para a propagação pode ser um fator primordial para a domesticação e cultivo comercial de uma espécie, objetivando a obtenção de mudas de qualidade, que obedeçam ao padrão comercial (Pereira et al., 2002). Em mangabeira, o estudo de genótipos para a obtenção de material propagativo é de extrema importância para que futuramente possa haver a introdução desta espécie em campos de cultivo comercial.

Resultados semelhantes quanto às variações no comportamento germinativo e sobrevivência foram verificados por alguns autores como Silva et al. (2009), trabalhando com progênies de bacabi (*Oenocarpus mapora* Karsten) e bacaba (*Oenocarpus distichus* Mart.), concluíram que a porcentagem de plantas normais emergidas variou de 27,9% a 98,9%. Em progênies de pitanga-Vermelha (*Eugenia calycina*) foi verificada diferenças quanto ao índice de velocidade de emergência, variando entre 0,160 e 0,289 (Freitas et al., 2015). Em estudos com sementes de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb), Mouta et al. (2013) verificaram que a variação no caráter taxa de sobrevivência entre progênies foi de 50 a 100%, com média de 93,4%. Assim como a mangabeira, estas espécies são alógamas, e as variações encontradas podem ser devido ao sistema de reprodução.

A variação no comportamento germinativo das progênies pode estar associada à informação genética e às diferentes procedências de cada acesso. Isto reforça a hipótese de que plantas originadas em regiões geograficamente distintas podem evidenciar alta variabilidade. Desta forma, o conhecimento deste material genético, constitui-se como uma importante ferramenta para a seleção dos melhores genitores visando a obtenção de genótipos, como também das melhores progênies para enriquecimento do BAGMangaba.

4.5. Agradecimentos

À Embrapa Tabuleiros Costeiros pelo suporte para a realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento da bolsa de doutorado.

4.6. Referências

Barros, S.C.L. & Souza Júnior, C.L. (2009) Interação de genótipos com ambientes no melhoramento de plantas. In: Seminários em genética e melhoramento de plantas departamento de genética. *Anais*. Piracicaba: Esalq.

Blank, A.F. Transformação de recursos genéticos de plantas aromáticas nativas em riqueza: o potencial do alecrim-de-tabuleiro (Lippia gracilis). Horticultura brasileira, v.31, n.3, 2013.

Brasil, Ministério da Agricultura e reforma Agrária (2009) *Regras para análises de sementes*. SNDA/DNDV/CLAV, Brasília.

Cardoso D.L., Silva R.F., Pereira M.G., Viana A.P. & Araújo E.F. (2009) Diversidade genética e parâmetros genéticos relacionados à qualidade fisiológica de sementes em germoplasma de mamoeiro. *Revista Ceres* 56: 572-579.

Correa A.M. & Gonçalves M.C. (2012) Divergência genética em genótipos de feijão comum cultivados em Mato Grosso do Sul. *Revista Ceres* 59: 206-212.

Costa T.S., Silva A.V.C., Lédo A.S., Santos A.R.F. & Silva Júnior J.F. (2011) Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46: 499-508.

Diniz F.O., Madeiros Filho S., Bezerra A.M.E. & Moreira F.J.C. (2015) Biometria e morfologia da semente e plântula de oiticica. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 10: 183-187.

Farias Neto J.T., Carvalho, J.U. & Muller C.H. (2004) Estimativas de correlação e repetibilidade para caracteres do fruto de bacurizeiro. *Ciência e Agrotecnologia* 28: 300-305.

Freitas M.B.F. & Costa, R.R.G.F. (2015) Estimativas dos componentes de variância genética entre e dentro de progênies de pitanga-vermelha. *Global Science Technology* 8: 78-86.

Ganga R.M.D., Ferreira G.A., Chaves L.J., Naves R.V. & Nascimento J.L. (2010) Caracterização de Frutos e Árvores de Populações Naturais de *Hancornia speciosa* Gomes do Cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura* 32: 111-113.

Gonçalves L.G.V., Andrade F.R., Marimon Junior B.H., Schossler T.R., Lenza E. & Marimon B.S. (2013) Biometria de frutos e sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) em vegetação natural na região leste de Mato Grosso, Brasil. *Revista de Ciências Agrárias*, 36: 31-40.

Husson F.; Josse J. & Lê S. (2008) FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software* 25: 1-18.

Leão N.V.M., Felipe S.H.S., Shimizu, E.S.C., Santos Filho B.G., Kato O.R. & Benchimol R. L (2015) Biometria e diversidade de temperaturas e substratos para a viabilidade de sementes de ipê amarelo. *Informativo Abrates*, 25: 50-54.

Magalhães A.C.N (1986) Análise quantitativa de crescimento. In: Ferri M.G. *Fisiologia vegetal*. EDUSP, São Paulo, pp.331-350.

Maguire J.D. (1962) Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedlings emergence and vigor. *Crop Science* 2: 176-177.

Mariot M.P. & Barbieri R.L. (2010) Divergência genética entre acessos de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek e *M. aquifolium* Mart.) com base em caracteres morfológicos e fisiológicos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 12: 243-249.

Moura N.F., Chaves L.J., Naves R.V., Aguiar A.V. & Sobierajski G.R. (2013) Variabilidade entre procedências e progênies de Pequizero (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Scientia Florestalis* 41: 103-112.

Moura N.F. (2011) Caracterização de frutos e progênies de pequizeiro (Caryocar brasiliense Camb.) do Cerrado. Dissertação. Universidade Federal de Goiás. 150p.

Nascimento, A.L.S., Sá, A.J., Ledo, A.S. & Silva, A.V.C. (2017) Extração de DNA em mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Nucleus*, v.14: 97-106.

Nascimento S.M., Cardoso J.A. & Cocozza, F.D.M (2014) Caracterização física e físico-química de frutos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) no oeste da Bahia. *Revista Brasileira Engenharia Agrícola e Ambiental* 18: 856-860.

Oliveira S.A.G., Lopes M.T.G., Chaves F.C.M., Martins C.C. & Alves E.U. (2013) Estimation of generic parameters of *Plukenetia volubilis* L. seed germination. *Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environment Sciences* 56: 49-54.

Pereira A.V., Pereira E.B.C., Junqueira N.T.V., Fialho J.F. (2002) *Enxertia de mudas de pequizeiro*. Embrapa Cerrados, Planaltina.

Prete C.E.C. & Guerra E.P. (1999) Qualidade fisiológica das sementes. In: Destro D. & Montalván R. *Melhoramento genético de plantas*. UEL, Londrina, pp.661-676.

R Core Team. (2017) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

Rojas W. (2003) Análisis multivariado em estudios de variabilidad genética. In: Franco T. & Hidalgo R. *Análisis estadístico del datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos*. IPGRI, Roma, pp.85-89.

SAS Institute (2011) SAS/STAT Userøs guide, Version 9.1. Cary, USA, SAS Institute.

Silva R.A.M., Mota M.G.C. & Farias Neto J.T. (2009) Emergência e crescimento de plântulas de bacabi (*Oenocarpus mapora* Karsten) e bacaba (*Oenocarpus distichus* Mart.) e estimativas de parâmetros genéticos. *Acta Amazonica* 39: 601-608.

Vaughton G. & Ramsey M. (1998) Sources and consequences of seed mass variation in Banksia marginata (Proteaceae). *Journal of Ecology* 86: 563-573.

Vechiato M.H. & Parisi J.J.D. (2013) Importância da qualidade sanitária de sementes florestais na produção de mudas. *O Biológico* 75: 27-32.

Vieira M.C., Naves R.V., Souza E.R.B., Paula M.S.P., Leandro W.M. & Moura N.F. (2017) Biometria de frutos de *Hancornia speciosa* (Gomes) de ocorrência natural no Cerrado do estado de Goiás. *Scientific Electronic Archives* 10: 6-12.

Vieira C.V., Souza E.R.B., Belo A.P.M., Paula M.S.P., Leandro W.M. & Moura N.F. (2017) Desenvolvimento de mudas de mangabeira provenientes de frutos de diferentes localidades do estado de Goiás. *Revista de Ciências Agrárias* 36:363-371.

Vieira C.V., Souza E.R.B., Belo A.P.M. & Camilo Y.M.V. (2013) Desenvolvimento de mudas de mangabeira provenientes de frutos de diferentes localidades do Estado de Goiás. *Revista de Ciências Agrárias* 36: 363-731.

Vieira Neto R.D., Silva Junior J.F. & Lédo A.S. (2009) Mangaba. In: Santos-Serejo J.A., Dantas J.L.L., Coelho C.V.S., Coelho Y.S. *Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas*. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp. 323-338.

Vieira Neto R.D. (2002) Mangaba. *In*: Vieira Neto R.D. *Fruteiras potenciais para os tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas*. Embrapa Tabuleiros Costeiros/ Emdagro, Aracaju, pp.115-140.

Villachica, H. (1996) *Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia*. Tratado de Cooperación Amazonica, Lima.

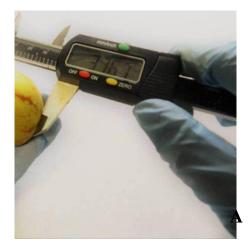
Zuffo A.M., Andrade R.A., & Zuffo Júnior J.M. (2014) Caracterização biométrica de frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.) na região leste de Mato Grosso, Brasil. *Revista de Ciências Agrárias* 37: 463-471.

Zuffo A.M., Gesteira G.S., Zuffo Júnior J.M., Andrade F.R., Soares I.O., Zambiazzi E.V., Guilherme S.R. & Santos A.S. (2016) Caracterização biométrica de frutos e sementes de mirindiba (*Buchenavia tomentosa* Eichler) e de inajá (*Attalea maripa* [Aubl.] Mart.) na região sul do Piauí, Brasil. *Revista de Ciências Agrárias* 39: 331-340.

FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Origem, identificação da matriz e codificação dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga døAjuda, SE.

Origem	Matriz	Acesso/Código
Mata de São João, BA	P1	Lagoa Grande ó LGP1
Mata de São João, BA	P3	Lagoa Grande ó LGP3
Mata de São João, BA	P4	Lagoa Grande ó LGP4
Indiaroba, SE	P1	Pontal - PTP1
Indiaroba, SE	P2	Pontal - PTP2
Indiaroba, SE	P4	Pontal - PTP4
Indiaroba, SE	P5	Pontal - PTP5
Indiaroba, SE	P1	Terra Caída - TCP1
Indiaroba, SE	P2	Terra Caída - TCP2
Indiaroba, SE	P6	Terra Caída - TCP6
Salvaterra, PA	P1	Água Boa - ABP1
Salvaterra, PA	P2	Água Boa - ABP2
Salvaterra, PA	P4	Água Boa - ABP4
Conde, BA	P2	Barra de Itariri- BIP2
Conde, BA	P4	Barra de Itariri - BIP4
Jandaíra, BA	P5	Costa Azul - CAP5
Indiaroba, SE	P5	Preguiça ó PRP5





Fotos: Adrielle Naiana Ribeiro Soares

Figura 1. Exemplos de avaliação biométrica frutos (A) e sementes (B) de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga døAjuda, SE.



Figura 2. Progênie de mangaba aos seis meses após a semeadura (A); avaliação do diâmetro do caule (B) e da altura da planta (C).

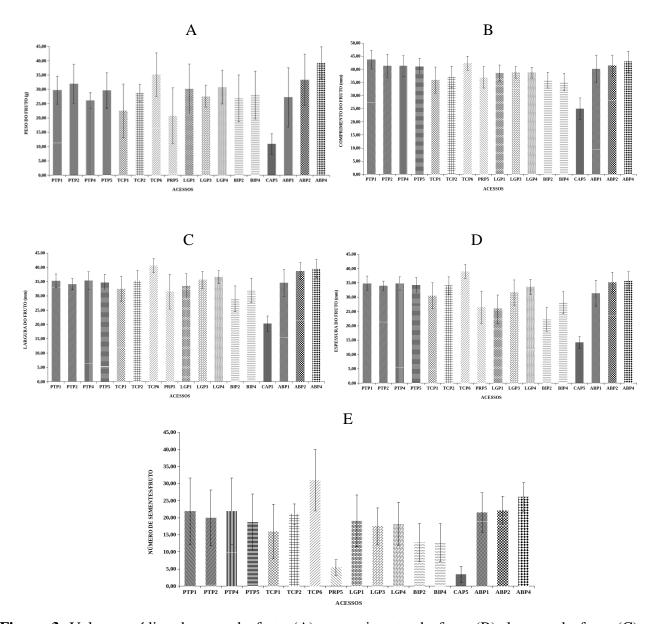


Figura 3. Valores médios de peso do fruto (A); comprimento do fruto (B); largura do fruto (C); espessura do fruto (D) e número de sementes por fruto (E) de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga døAjuda, SE.

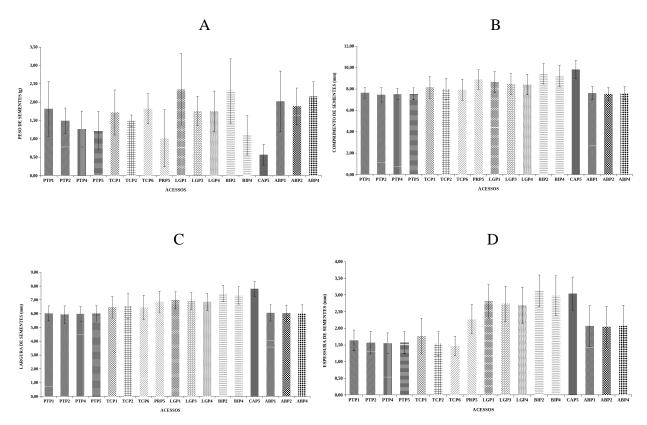


Figura 4. Valores médios do peso de sementes por fruto (A); comprimento da semente (B); largura da semente (C) e espessura da semente (D) de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga døAjuda, SE.

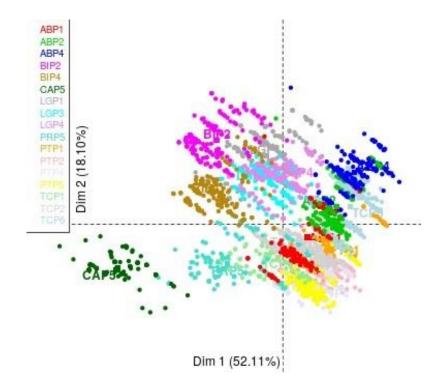


Figura 5. Análise de Componentes Principais (PCA) para a biometria de frutos e sementes de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga døAjuda, SE.

Tabela 2. Correlação de Pearson para as variáveis: comprimento de frutos (CF); largura de frutos (LF); espessura de frutos (EF); peso de frutos (PF); número de sementes por fruto (NSF); comprimento de sementes (CS); espessura de sementes (ES); largura de sementes (LS) e peso de sementes (PS) de acessos de mangabeira do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga døAjuda, SE.

		,r <i>E</i>	,,,	~					
	CF	LF	EF	PF	NSF	CS	ES	LS	PS
CF	1.000								
LF	0.703**	1.000							
EF	0.689**	0.893**	1.000						
PF	0.619**	0.716**	0.587**	1.000					
NSF	0.409**	0.559**	0.566**	0.583**	1.000				
CS	-0.298**	-0.259**	-0.400**	-0.084*	-0.315**	1.000			
ES	-0.250**	-0.213**	-0.449**	-0.019^{ns}	-0.259**	0.502**	1.000		
LS	-0.268**	-0.230**	-0.365**	-0.060^{ns}	-0.291**	0.714**	0.494**	1.000	
PS	0.299**	0.390**	0.201**	0.576**	0.519**	-0.023^{ns}	0.183**	0.0145^{ns}	1.000

^{** -} significativo a 1% de probabilidade; * - significativo a 5% de probabilidade; ns - não significativo;

Tabela 3. Porcentagem de emergência (PE%), índice de velocidade de emergência (IVE), porcentagem de sobrevivência (S%), altura (ALT), diâmetro do caule (DC) e número de folhas (NF) de progênies de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga døAjuda, SE.

ACESSOS	PE (%)	IVE	S (%)	ALT (cm)	DC (mm)	NF
LGP1	100 a	1,34 a	100 a	29,90 bc	2,73 bc	24 abc
LGP3	100 a	1,29 ab	100 a	29,25 bc	2,69 bc	25 abc
LGP4	100 a	1,17 abcd	100 a	31,80 bc	2,41 c	26 abc
PTP1	95 ab	1,04 cd	100 a	37,26 abc	2,52 c	23 bc
PTP2	95 ab	1,15 abcd	75 c	33,13 bc	2,74 bc	22 c
PTP4	100 a	1,07 bcd	100 a	27,56 bc	2,69 bc	26 abc
PTP5	100 a	1,02 cd	100 a	26,63 c	2,70 bc	27 abc
TCP1	47 d	0,64 e	61 d	38,10 ab	3,03 bc	28 abc
TCP2	100 a	1,24 abc	100 a	31,20 bc	3,02 bc	26 abc
TCP6	100 a	0,98 d	100 a	37,10 abc	2,98 bc	33 a
ABP1	100 a	1,20 abcd	88 b	38,35 ab	3,46 b	29 abc
ABP2	100 a	1,14 abcd	100 a	33, 27 bc	2,43 c	25 abc
ABP4	90 abc	1,04 cd	100 a	45,10 a	4,43 a	29 abc
BIP2	85 bc	1,04 cd	100 a	38,35 ab	3,46 b	29 abc
BIP4	45 d	0,59 e	54 e	36,55 abc	4,43 a	32 ab
CAP5	55 d	0,58 e	54 e	26,50 c	2,40 c	24 abc
PRP5	45 d	0,61 e	51 e	28,73 bc	2,25 c	26 abc
CV %	11,80	13,96	1,67	19,54	18,20	19,81

^{*}Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

5. ARTIGO 2

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS E DAS PRIMEIRAS PROGÊNIES DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DE MANGABA DA EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS

Periódico submetido: Biodiversity and Conservation

RESUMO

A mangabeira (Hancornia speciosa Gomes) é uma espécie frutífera, nativa do Brasil, ainda pouco explorada. No estado de Sergipe, possui importância scoioeconômica, sendo considerada como árvore símbolo do estado. Apesar da sua importância, esta espécie vem sofrendo uma grande deriva genética, devido principalmente à ações antrópicas. A caracterização molecular tem sido realizada com sucesso em populações naturais da região Nordeste, como também em bancos de germoplasmas. O trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a variabilidade genética de acessos e progênies do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Foram utilizadas 96 amostras e selecionados quatro marcadores microssatélites. Avaliou-se o número de alelos (A), a riqueza alélica (R) a heterozgosidade esperada (He) e coeficiente de endogamia (f). A diversidade genética foi estimada por meio do índice de divergência genética (Fst) e a identidade genética de Nei (GI). A relação de parentesco entre progênies e matrizes também foi avaliada. A heterozigosidade média observada foi menor do que o esperado, mostrando um excesso de homozigotos, corroborados pelo coeficiente positivo de endogamia. O índice de diversidade genética (Fst) e a identidade genética de Nei (GI) revelaram, em geral, uma diversidade genética moderada entre acessos. A relação entre matrizes e progênies mostrou que pode haver maior grau de compartilhamento de informação genética entre os acessos ABP1 e ABP2. Os resultados irão colaborar na gestão desses recursos genéticos e na elaboração de estratégias em futuro programa de melhoramento genético da mangabeira.

Palavras-chave: *Hancornia speciosa* Gomes, frutas nativas, marcadores microssatélites, recursos genéticos.

ABSTRACT

Genetic diversity of the accessions and the first generation of progenies of the mangaba genebank in the Embrapa Coastal Tablelands

The mangabeira (Hancornia speciosa Gomes) is a fruit tree species that is a native of Brazil. It is still only a little explored. In the State of Sergipe, it has a socioeconomic importance, while it is also considered as the tree symbol of the State. Despite its importance, this species has been suffering from a great genetic drift, mainly due to the anthropical actions of man. Its molecular characterization has been successfully performed in natural populations in the Northeastern region of the State, as well as in germplasm banks. This work has aimed at evaluating the genetic variabilities of the accessions and the progenies of the Mangaba Genebank in the Embrapa Coastal Tablelands. Ninety-six samples were used and four microsatellite markers were selected. The number of alleles (A), their allelic richness (R) and the expected heterozygosities (He), as well as their inbreeding coefficients (f), were all evaluated. Their genetic diversities were estimated by using the genetic divergence index (Fst), together with Neiøs measures of genetic identity (GI). The kinship relationships between the progenies and the matrices were also evaluated. The mean heterozygosities that were observed were lower than expected, showing an excess of homozygotes. This was corroborated by the positive endogamy coefficients. The genetic diversity indexes (Fst) and the genetic identities (GI) of Nei revealed, in general, a moderate genetic diversity among the accessions. The relationships between the matrices and the progenies showed that there may be a greater degree of genetic information sharing between the ABP1 and ABP2 accessions. The results of this research will help to collaborate in the management of these genetic resources, as well as in the elaboration of strategies, for future improvements in the genetic breeding programs for this mangabeira fruit tree.

Keywords: *Hancornia speciosa* Gomes, native fruits, microsatellite markers, genetic resources

5.1. Introdução

A mangabeira (Hancornia speciosa Gomes - Apocynaceae) é uma espécie frutífera brasileira, que ocorre em vários habitats, incluindo o Cerrado e as restingas da Mata Atlântica, onde possui importância econômica, social e cultural (Silva et al., 2011). O fruto é usado para fabricação de sorvetes, concentrados de frutas, geleias e licores (Costa et al., 2011). A casca também é usada na medicina popular e na produção de látex (Arruda et al., 2016). Apesar da crescente importância agroindustrial da mangaba, o extrativismo ainda apresenta-se como a principal forma de exploração da espécie.

A exploração inadequada dos frutos de mangaba, bem como a fragmentação do habitat natural da espécie, causam a diminuição do tamanho populacional, comprometendo as futuras gerações por meio de mecanismos de regeneração natural. Esta condição, ao longo do tempo, pode diminuir a variabilidade genética em populações naturais, propiciando indivíduos menos vigorosos, com possível perda de caracteres de importância econômica (Silva et al., 2017a).

O uso de estratégias ex situ, como em bancos de germoplasma, é fundamental para a conservação da diversidade genética da espécie. Considerando que grande parte das populações naturais de mangaba já estão devastadas, a Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), mantem desde 2006, o Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba (BAGMangaba), credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), órgão do Ministério do Meio Ambiente (MMA), fiel depositário do patrimônio genético da espécie (processo número como 02000.002581/2014-53).

A caracterização e o conhecimento da diversidade das coleções em bancos de germoplasma são os primeiros passos para a identificação de duplicatas e genitores, o que possibilitará a obtenção de híbridos com maior potencial comercial (Freitas et al., 2012) e é uma forma de conciliar os esforços de conservação da biodiversidade com o desenvolvimento sustentável.

A pesquisa sobre a mangaba é recente, especialmente os estudos de diversidade genética usando diferentes marcadores moleculares, como RAPD (Costa et al., 2011; Silva et al., 2011), ISSR (Soares et al., 2016; Soares et al. 2017, Jimenez et al., 2015; Silva et al., 2017b) e SSR (Amorim et al., 2015; Rodrigues et al., 2015; Collevatti et al., 2016). Esses estudos fornecem conhecimento inicial da variabilidade genética para auxiliar na obtenção de estratégias de conservação, seleção de germoplasma e seu uso em futuros programas de melhoramento. A informação sobre a diversidade genética é uma ferramenta importante para estratégias de conservação e reprodução e pode ser abordada através de estudos de progênies.

O uso de ferramentas moleculares tornou-se uma forma eficaz para avaliar a diversidade genética e contribuir para a formação de cultivares em programas de melhoramento. Portanto, é fundamental compreender a variabilidade genética, especialmente de espécies nativas, como a mangaba (Ganga, Chaves e Naves, 2009).

Os marcadores microssatélites (SSR) são importantes ferramentas devido à sua natureza codominante, a capacidade de detectar altas taxas de polimorfismo e sua alta reprodutibilidade (K lliker, Rosellini e Wang, 2010). Esses marcadores já foram caracterizados e testados com sucesso em populações nativas de mangaba do Nordeste (Amorim et al., 2015) e do Cerrado (Rodrigues, et al. 2015).

Este foi o primeiro trabalho com avaliação de progênies do BAGMangaba, visando ampliar o conhecimento do material genético presente no banco, assim, o estudo de progênies é essencial para que futuramente seja possível a identificação e seleção dos melhores genitores a serem utilizados em programas de melhoramento da mangabeira.

Desta forma, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estimar a diversidade genética de acessos e das primeiras progênies do BAGMangaba, utilizando marcadores microssatélites, visando o conhecimento dos recursos genéticos presentes no banco de germoplasma.

5.2. Material e Métodos

O Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba (Figura 1) ocupa uma área de restinga, no município de Itaporanga d'Ajuda, estado de Sergipe, Brasil (11°06'40 'e e 37°11'15"W). A primeira frutificação ocorreu em 2013 (Silva et al., 2015), e durante a segunda colheita, em 2014, os frutos foram coletados e suas sementes foram usadas para originar as primeiras progênies.



Figura 1. Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga døAjuda, SE.

Os frutos foram colhidos (Figura 2A-B), despolpados (2C) e as sementes foram tratadas (imersas em solução de hipoclorito de sódio 2,5% durante três minutos), depois lavadas em água destilada e, em seguida, secas à sombra, a 25°C. Após 24 horas, em casa de vegetação, as sementes foram semeadas em sacos de polietileno, contendo areia como substrato (Figura 2C-D). Após seis meses de crescimento, as folhas de cada progênie foram coletadas para análises moleculares (Figura 2D). O número de progênies por matriz variou de 7 a 10, para um total de 96 indivíduos, dos quais 87 são progênies oriundas de nove acessos (Tabela 1).



Figura 2. Frutos de mangabeira na ávore (A), colhidos (B), despolpa (C) e progênie aos seis meses (D).

Tabela 1. Origem dos acessos (matrizes) do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros e número de progênies utilizadas para estudo de diversidade genética.

Acessos	Origem	Nº de progênies
LGP3	Mata de São João, Bahia	10
PTP4	Indiaroba, Sergipe	10
TCP2	Indiaroba, Sergipe	10
TCP6	Indiaroba, Sergipe	7
ABP1	Salvaterra, Pará	10
ABP2	Salvaterra, Pará	10
BIP2	Conde, Bahia	10
BIP4	Conde, Bahia	10
CAP5	Jandaíra, Bahia	10

O DNA genômico total foi isolado a partir de tecido de folhas congeladas a -80°C, com base no protocolo do brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) (Doyle e Doyle, 1990), modificado por Alzate-Marin et al. (2009). O DNA extraído foi diluído em 50 L de TE e amplificado diretamente, utilizando 16 pares de iniciadores (Rodrigues et al., 2015).

As reações de PCR foram realizadas em 10 L do volume total; a mistura da reação continha 1,0 L de DNA genômico, 1,0 L de tampão de PCR Taq 10x, 0,8 L de MgCl2 (25 mM), 0,2 L de dNTP (mistura 2,5 mM), 1,0 L de cada iniciador (5mM, frente-6-FAM e reverso - HEX), 0,1 L de U Taq polimerase e 4,9 L de água ultrapura. As condições de ciclagem térmica foram 94°C durante 1 min; 35 ciclos de 95°C por 1 min, temperatura de recozimento específica para cada locus (Tabela 2) durante 1 min e 72°C por 1 min. Os produtos de PCR gerados a partir de um total de 96 amostras de acessos/progênies de mangaba foram genotipados em um sequenciador de material genético, modelo, ABI de 3730 (Applied Biosystems, Carlsbad, Califórnia, EUA) no Centro Interdisciplinar de Pesquisa em Biotecnologia da Universidade da Flórida. Os picos foram marcados usando o *software* GeneMarker 1.6 (SoftGenetix, State College, Pensilvânia, EUA), com correções manuais conforme necessário.

A diversidade genética foi analisada por meio das seguintes determinações: i) número de alelos (A); ii) riqueza alélica (R); iii) heterozigozidade observada (Ho) e esperada (He) usando um método da rarefação (El Mousadik e Petit, 1996). A heterozigozidade observada (Ho) e esperada (He), calculada seguindo as proporções de Hardy-Weinberg. Um método de rarefação (Hurlbert, 1971), modificado por El Mousadik e Petit (1996), foi aplicado para corrigir o número observado de alelos de acordo com o tamanho da amostra. A presença de endogamia foi investigada pelo índice de fixação (f), e a significância estatística foi testada usando 1000 permutações de Monte Carlo de alelos entre indivíduos. Todas as análises foram realizadas utilizando o software FSTAT (Goudet, 1995). Como cada progênie recebeu pelo menos um alelo materno, o índice de fixação (f) foi estimado usando F = 1- (F) (F) (F) (F).

As matrizes do divergência genética (Fst) e identidade genética de Nei (GI) foram obtidas por meio do *software* Genalex. 6.3 (Peakall e Smouse, 2006). A relação entre progênies e matrizes foi avaliada usando o pacote *pedigreemm* (Vazquez et al., 2014) implementado no *software* R (R Core Team, 2017).

Tabela 2. Temp	peratura de	anelamento (Ta), motivos	de repetição,	amplitude	alélica	(pb) e	e
fluorescência de	iniciadores 1	microssatélites	testados para	a caracterizaçã	ão genética	de mang	gabeira.	

Iniciador	Ta(°C)	Motivos de repetição	Amplitude alélica(pb) ¹	Fluorescência
HS01	56	$(GCA)_6(TC)_{20}(GCA)_8$	250 a 310	HEX
HS03	56	$(CT)_5(CT)_5$	120 a 180	6-FAM
HS05	56	$(GA)_{15}(TGC)_6$	200 a 300	HEX
HS06	54	$(GA)_{14}$	100 a 150	HEX
HS08	52	$(CA)_6(CT)_{17}$	200 a 250	6-FAM
HS09	56	$(CT)_7(CT)_{10}(CT)_6$	200 a 300	6-FAM
HS10	56	$(CT)_{14}(CT)_{8}$	100 a 200	HEX
HS11	56	$(GA)_{17}$	100 a 200	6-FAM
HS16	54	$(GA)_{12}$	100 a 150	6-FAM
HS17	56	$(GA)_{16}$	100 a 200	HEX
HS18	56	$(AG)_{14}$	300 a 350	6-FAM
HS20	56	$(CT)_{11}$	200 a 250	HEX
HS27	54	$(GA)_{14}$	100 a 150	6-FAM
HS30	56	$(AG)_{10}$	180 a 200	HEX
HS32	56	$(CT)_9$	200 a 300	6-FAM
HS33	56	(AG) ₂₄	80 a 120	6-FAM

^{*} Os iniciadores destacados em negrito foram os selecionados.

5.3. Resultados e Discussão

Dos 16 marcadores microssatélites utilizados, quatro (HS01, HS05, HS06 e HS10) foram avaliados como polimórficos por permitirem a amplificação de bandas claras e consistentes. Os resultados para o número de alelos (A), riqueza alélica (R), heterozigosidade esperada (*He*), heterozigosidade observada (*Ho*) e coeficiente de endogamia (*f*) foram representados na Tabela 3.

Tabela 3. Número de amostras (n), número de alelos (A), riqueza alélica (R), heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho) e coeficiente de endogamia (f) em relação aos quatro locos avaliados para progênies de nove acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga døAjuda, SE.

Acessos	n	A	R	He	Но	f
LGP3	10	7,0	5,48	0,83	0,60	0,14
PTP4	10	9,0	6,49	0,87	0,50	0,08
TCP2	10	7,6	5,12	0,78	0,48	0,24
TCP6	7	7,0	6,43	0,91	0,43	0,08
ABP1	10	9,0	6,52	0,92	0,70	0,51
ABP2	10	7,0	6,11	0,85	0,40	0,06
BIP2	10	9,0	6,66	0,90	0,30	0,09
BIP4	10	9,3	6,77	0,91	0,50	0,39
CAP5	10	7,3	6,13	0,90	0,70	0,28
Médias		8,0	6,10	0,87	0,51	0,21

O número de alelos (A) variou de 7 a 9,3. Em acessos de mangaberia Collevatti et al. (2016) verificaram maior variação (2 a 27) para o número de alelos, utilizando marcadores microssatélites.

Os resultados da riqueza alélica (R) revelaram que as progênies com o maior número de alelos também possuem maiores valores para a riqueza alélica. A distribuição da frequência e da riqueza alélica pode provocar a diminuição da variabilidade genética, influenciar a presença de heterozigotos, como também as decisões a serem tomadas em um programa de conservação (Rodriguez-Rodriguez et al., 2010).

Em todas as progênies, a heterozigosidade média esperada (*He*) foi maior do que a heterozigosidade média observada (*Ho*), sugerindo um excesso de homozigotos, conforme esperado para as populações no Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Alta variação do He (0,62-0,94) em populações de mangabeira foi encontrada por Rodrigues et al. (2015). Costa et al. (2017) verificaram que o Ho (0,698) foi inferior ao He (0,750) em estudos com *H. speciosa*.

Todas as progênies obtiveram coeficiente de endogamia médio positivo (f), confirmando o excesso de homozigotos. Os maiores valores de f foram observados em progênies dos acessos ABP1 (0,51), BIP4 (0,39) e CAP5 (0,28), e os menores nas progênies de PTP4 (0,08), TCP6 (0,08); ABP2 (0,06) e BIP2 (0,09). Amorim et al. (2015) também encontraram coeficientes de endogamia positivos (0,12-0,40) em populações naturais de mangabeira, devido provavelmente ao cruzamento entre indivíduos geneticamente relacionados. Em geral, o coeficiente de endogamia positivo revela um excesso de homozigotos e menos heterozigotos do que o esperado, de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Coeficientes de endogamia positivos podem refletir em efeitos deletérios para espécies (Govindaraj et al., 2015), contribuindo para que haja maior estruturação entre acessos.

Os resultados deste estudo sugerem um efeito de endogamia nas progênies avaliadas, com base no excesso de homozigotos, o que pode não ser interessante para o banco de germoplasma de mangaba, pois o excesso de homozigotos pode interferir na variabilidade das carcterísticas desejáveis para futuro melhoramento da espécie. Isto pode ser um indicativo da necessidade de enriquecimento do banco, por meio do acréscimo de mais indivíduos.

Os índices de divergência genética na maioria dos cruzamentos indicaram moderada diversidade (0,05 - 0,15) de acordo com Wrigth (1969), exceto para os pares formados entre as progênies dos acessos ABP1 x BIP4; ABP1 x TCP6; ABP2 x BIP4; ABP2 x CAP5; ABP2 x LGP3; ABP2 x PTP4; ABP2 x TCP2 e ABP2 x TCP6 (intervalo 0,280 - 0,599). Os cruzamentos entre as progênies dos acessos PTP4 x TCP2; PTP4 x TCP6 e TCP2 x TCP6 resultaram em menores valores de Fst (Tabela 4). Estes resultados indicam que está havendo troca de material genético entre os acessos do banco, com isso novas combinações alélicas podem reduzir a diferenciação entre eles. Como a mangabeira é uma espécie alógama, e a polinização no banco de germoplasma é aberta, provalvemente a pequena distância entre as plantas pode favorecer o cruzamento entre indivíduos aparentados, causando a diminuição da variabilidade genética e aumento da endogamia.

A matriz de identidade genética de Nei (GI) (Tabela 5) revelou que as progênies dos acessos CAP5, LGP3 (estado da Bahia), PTP4, TCP2 e TCP6 (estado de Sergipe) foram mais semelhantes entre si, com valores de similaridade variando de 0,521 a 0,95. A maioria dos cruzamentos envovlendo as progênies dos acessos do estado do Pará (ABP1 e ABP2) resultaram em maior distância genética, sugerindo que sejam mais divergentes em relação aos demais. Assim, pode haver uma relação entre a distância genética e a geográfica, também abordada por Amorim et al. (2015), em populações naturais de mangabeira.

Tabela 4. Matriz de divergência correlacionando *Fst* (índice de divergência genética) entre progênies de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga døAjuda, SE.

	0 ,	J /							
ABP1	ABP2	BIP2	BIP4	CAP5	LGP3	PTP4	TCP2	TCP6	
0,000									ABP1
0,057	0,000								ABP2
0,051	0,056	0,000							BIP2
0,280	0,330	0,065	0,000						BIP4
0,174	0,400	0,130	0,128	0,000					CAP5
0,089	0,406	0,098	0,130	0,120	0,000				LGP3
0,074	0,413	0,140	0,084	0,109	0,071	0,000			PTP4
0,123	0,507	0,077	0,057	0,110	0,055	0,042	0,000		TCP2
0,563	0,599	0,057	0,069	0,050	0,079	0,036	0,023	0,000	TCP6

Tabela 5. Matriz de identidade genética (GI) de Nei entre progênies de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Itaporanga døAjuda, SE.

			1				<u> </u>	, ,	
ABP1	ABP2	BIP2	BIP4	CAP5	LGP3	PTP4	TCP2	TCP6	
1,000									ABP1
0,398	1,000								ABP2
0,108	0,141	1,000							BIP2
0,125	0,266	0,227	1,000						BIP4
0,072	0,324	0,256	0,629	1,000					CAP5
0,087	0,154	0,167	0,244	0,876	1,000				LGP3
0,284	0,138	0,184	0,209	0,939	0,945	1,000			PTP4
0,230	0,126	0,130	0,152	0,521	0,678	0,900	1,000		TCP2
0,127	0,158	0,078	0,070	0,980	0,789	0,840	0,950	1,000	TCP6

A relação entre progênies e matrizes (Tabela 6) mostrou que pode haver um maior compartilhamento de material genético entre todas as progênies do acesso ABP1 (0,50), seguido pelos acessos ABP2 (0,25). As progênies provenientes do acesso CAP5, em sua maioria, obtiveram menores valores.

A escolha dos genitores pode influenciar a diversidade genética, como também a descoberta e utilização de genes responsáveis por características de interesse agronômico, possibilitando a obtenção de plantas superiores. Assim, o estudo de progênies, constitui-se como um avanço de conhecimento, para que se possa realizar uma seleção mais rigorosa de genitores e um melhor planejamento dos cruzamentos, uma vez que a seleção de matrizes altamente divergentes pode possibilitar o aumento da segregação de indivíduos superiores em gerações futuras.

Tabela 6. Relação entre progêni	es e matrizes de acessos do	Banco Ativo	de Germoplasma de
Mangaba da Embrapa Tabuleiros (Costeiros, Itaporanga døAjuda	, SE.	

Progênies										
Matrizes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ABP1	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
ABP2	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250
BIP2	0,230	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250
BIP4	0,230	0,230	0,230	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250
CAP5	0,230	0,230	0,230	0,230	0,230	0,230	0,230	0,125	0,250	0,250
LGP3	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,230	0,230	0,230
PTP4	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,125	0,230	0,230	0,230
TCP2	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,230	0,230	0,230
TCP6	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,230			

A mangabeira vem sofrendo elevada ação antrópica, comprometendo a sobrevivência da espécie, que faz parte de um contexto socioeconômico cultural nas áreas de ocorrência. Pesquisas sobre a distribuição e a composição genética são importantes para elaboração de estratégias de conservação e melhoramento da espécie, e o BAGMangaba é um exemplo disso. Em Sergipe, além dele, existem 1.232,30 hectares distribuídos em seis reservas privadas, sendo a maior delas a RPPN do Caju, também localizada em Itaporanga d'Ajuda, com 763,37 hectares (ICMBIO, 2016). Como a frutificação da espécie no BAGMangaba foi recente, este foi o primeiro relato sobre as progênies deste germoplasma, possibilitando um diagnóstico preliminar de sua diversidade. As ações de enriquecimento deste germoplasma são constantes e os resultados, embora preliminares, ajudarão a construir estratégias de seleção, cruzamento e direcionar novas pesquisas.

5.4. Conclusões

A diversidade genética moderada pode indicar necessidade de estratégias de enriquecimento do germoplasma.

As progênies dos acessos ABP1 e ABP2 (Pará) são as mais divergentes das demais e podem ser indicadas para introdução no BAGMangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

5.5. Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica e Tecnológica (CNPq) pelo apoio financeiro do MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 (processo nº 9461020/2014-9) e SWE (203542/2014-2); o Laboratório de Sistemática Molecular e Genética da Evolução da Universidade da Flórida (DSc. Douglas Soltis e DSc. Pamela Soltis), por todo o apoio à SOARES, A.N.R. durante à pesquisa; e Embrapa Tabuleiros Costeiros por apoiar este projeto.

5.6. Referências

Alzate-Marin AL, Guidugli MC, Soriani HH, Martinez, CA, Mestriner MA (2009) An Efficient and Rapid DNA Minipreparation Procedure Suitable for PCR/SSR and RAPD Analyses in Tropical Forest Tree Species. Brazilian Archives of Biology and Technology 52(5):1217-1224.

Amorim JAE, Mata LR, Ledo AS, Azevedo VCR, Silva AVC (2015) Diversity and genetic

- structure of mangaba remnants in states of northeastern Brazil. Genetics and Molecular Research 14(1): 823-833.
- Arruda AS, Faria RQ, Peixoto N, Moreira ASFP, Floriano JF, Graef CFO, Gonçalves PJ, Almeida LM (2016) Mangabeira latex production evaluation in cerrado region from Goiás. Ciência Florestal 26(3): 939-948.
- Collevatti RG, Olivatti AM, Telles MPC, Chaves LJ (2016) Gene flow among *Hancornia speciosa* (Apocynaceae) varieties and hybrid fitness. Tree Genetics & Genomes 12 (74): 74-86.
- Costa CF, Collevatti RG, Chaves LJ, Lima JS, Soares TN, Telles MPC (2017) Genetic diversity and fine-scale genetic structure in Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae). Biochemical Systematics and Ecology 72: 63-67.
- Costa TS, Silva AVC, Ledo ASL, Santos ARF, Silva Júnior JF (2011) Genetic diversity of accessions of the mangaba germplasm bank in Sergipe. Pesquisa Agropecuária Brasileira 46(5): 499-508, 2011.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
- El Mousadik A, Petit RJ (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree *Argania spinosa* (L.) Skeels endemic to Morocco. Theoretical and Applied Genetics 92(7): 832-839.
- Freitas MKC, Coimbra RR, Aguiar GB, Aguiar CBN, Chagas DB, Ferreira WM, Oliveira RJ (2012) Phenotypic variability and morphologic characterization of a natural population of *Hancornia speciosa* Gomes. Bioscience Journal 28(5): 833-841.
- Ganaga RMD, Chaves LJ, Naves RV (2009). Genetic parameters in *Hancornia speciosa* Gomes progenies from Cerrado. Scientia Forestalis 37 (84): 395-404.
- Goudet J (1995). FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. Journal of Heredity 86 (6): 485-486.
- Govindaraj M, Vetriventhan M., Srinivasan M (2015). Importance of Genetic Diversity Assessment in Crop Plants and Its Recent Advances: An Overview of Its Analytical Perspectives. Genetics Research International, 2015: 1-14.
- Hurlbert SH (1971) The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. Ecology 52(4): 577-586.
- ICMBIO (Instituto Chico Mendes MMA) (2016). Reservas particulares do patrimônio natural, RPPN, Sergipe. ICMBIO, Brazil. http://sistemas.icmbio.gov.br/simrppn/publico/detalhe/763/.
- Jimenez HJ, Martins LS, Montarrovos AV, Silva Júnior JF, Alzate-Marin AL, Moraes Filho RM (2015) Genetic diversity of the Neotropical tree Hancornia speciosa Gomes in

- natural populations in Northeastern Brazil. Genetics and Molecular Research 14(4): 17749-17757.
- Kolliker R, Rosellini D, Wang Z (2010). Development and application of Biotechological and Molecular Genetic Tools. In: Boller B, Posselt UK, Veronesi F. (2010) Fodder Crops and Amenity Grasses. New York: Springer Science v.5, p. 89-113.
- Nei M (1977) F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. Annals of Human Genetics 41(2): 225-233.
- Peakall R, Smouse PE (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology, Notes 6: 288-295.
- Rodrigues AJL, Yamaguishi AT, Chaves LJ, Coelho ASG, Lima JS, Telles (2015) Development of microsatellite markers for *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). Genetics and Molecular Research 14(3): 7274-7278.
- Rodriguez-Rodriguez MP, Lopera-Barrero NM, Ribeiro RP, Povh JA, Sirol RN, Jacometo CB (2010) Genetic diversity of piracanjuba used in stock enhancement programs with microsatellite markers. Pesquisa Agropecuária Brasileira 45(1): 56-63.
- R Core Team. (2017) R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Silva AVC, Soares ANR, Ledo AS, Costa TS, Almeida CS, Amorim JAE, Santana PS, Vitoria MF (2017a) Uses and technological prospects for the mangaba, a native fruit of Brazil. African Journal of Biotechnology 16(7): 302-311.
- Silva AVC, Amorim JAE, Melo MFV, Ledo AS, Rabbani ARC (2017b) Genetic Diversity of Remaining Populations of Mangaba (Hancornia speciosa Gomes) in Restingas of Brazil. Journal of Agricultural Science 9(2): 46-52.
- Silva AVC, Silva Júnior JF, Moura CFH, Ledo AS, Menezes DNB, Vitoria MF, Amorim JAE (2015) Atributos de Qualidade e Funcionais de Acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Circular Técnica, n.71, p.1-7.
- Silva AVC, Santos ARF, Wickert E, Silva Júnior JF, Costa TS (2011) Genetic diversity between Hancornia speciosa Gomes varieties. Brazilian Journal of Agricultural Sciences 6(4): 572-578.
- Soares FS, Rossi AAB, Silva BM, Cochev JS, Paiva Sobrinho S, Luz PB (2017) Diversity and genetic structure of mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), a fruit species from Cerrado. Semina: Ciências Agrárias 38(4): 2479-2488.
- Soares ANR, Vitoria MF, Nascimento ALS, Ledo AS, Rabbani ARC, Silva AVC (2016) Genetic diversity in natural populations of mangaba in Sergipe, the largest producer State in Brazil. Genetics and Molecular Research 15 (3): 1503-8624.

- Vazquez AI (2014) Technical note: An R package for fitting generalized linear mixed models in animal breeding. Journal of Animal Science Abstract 88(2): 497-504.
- Wright S (1969) Evolution and the genetics of populations: the theory of gene frequencies. London: University of Chicago Press 511p.

6. ARTIGO 3

DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE MANGABA EM SERGIPE, O MAIOR ESTADO PRODUTOR DO BRASIL

Publicado no periódico: Genetics and Molecular Research

RESUMO

A mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) é encontrada em áreas de tabuleiros costeiros, no Nordeste brasileiro e na região do Cerrado. Esta espécie vem sofrendo elevada fragmentação de habitats, causado principalmente pela ação antrópica e exige estratégias de conservação. O objetivo deste estudo foi analisar a estrutura e diversidade genética inter e intrapopulacional em populações naturais de *H. speciosa* Gomes utilizando marcadores moleculares ISSR. Um total de 155 indivíduos foram amostrados em dez populações naturais (ITA, PAC, IND, EST, BC, PIR, JAP, BG, NEO, SANT), localizadas no estado de Sergipe, Brasil. Foram utilizados 15 iniciadores que geraram 162 fragmentos, com 100% de polimorfismo. A análise genética revelou que a variabilidade entre populações (77%) foi maior que dentro das populações (23%). Foi possível identificar cinco grupos divergentes por meio dos agrupamentos UPGMA e ACoP, e apenas um indivíduo (E10) permaneceu isolado. Por meio de marcadores ISSR foi possível obter um perfil molecular das populações avaliadas, mostrando que estes marcadores foram eficientes, apresentando polimorfismo suficiente para estimar a variabilidade genética em populações naturais de *H. speciosa* Gomes.

Palavras-chave: Genetic variability; *Hancornia speciosa* Gomes; ISSR markers; Species preservation

ABSTRACT

Genetic diversity of mangaba in natural populations in Sergipe, the biggest producer State in Brazil

Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) is found in areas of coastal tablelands in the Brazilian Northeast and Cerrado regions. This species has been subjected to habitat fragmentation that is mainly due to human activity, and requires conservation strategies. The aim of this study was to analyze the structure and inter- and intrapopulation genetic diversity of natural populations of *H. speciosa* Gomes using inter-simple sequence repeat (ISSR) molecular markers. A total of 155 individuals were sampled in 10 natural populations (ITA, PAC, IND, EST, BC, PIR, JAP, BG, NEO, and SANT) in the State of Sergipe, Brazil. Fifteen primers were used to generate 162 fragments with 100% polymorphism. Genetic analysis showed that the variability between populations (77%) was higher than within populations (23%). It was possible to identify five different groups by the unweighted pair group method with arithmetic mean and principal coordinate analysis, and only one individual (E10) remained isolated. Using ISSR markers it was possible to obtain a molecular profile of the populations evaluated, showing that these markers were effective and exhibited sufficient polymorphism to estimate the genetic variability of natural populations of *H. speciosa* Gomes.

Key words: Genetic variability; *Hancornia speciosa* Gomes; ISSR markers; Species preservation

6.1. INTRODUÇÃO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes - Apocynaceae) é uma espécie frutífera nativa do Brasil e que possui importância social, econômica e cultural nas áreas onde ocorre. Sergipe é o maior produtor da fruta, encontrada em populações naturais e explorada quase que totalmente de forma extrativista.

O fruto desta planta é bastante apreciado devido às suas características organolépticas e alto valor nutritivo, sendo rico em vitaminas A, B1, B2 e C, além de fósforo, cálcio e proteínas (Barros, 2006). A polpa é o principal produto e é consumida *in natura* ou como matéria-prima para a fabricação de diversos subprodutos como geleia, sorvete, suco, doce, compotas, vinho e vinagre (Costa et al., 2011). Assim, a espécie tem despertado interesse dos setores da indústria e comércio (Ganga et al., 2010).

Na região Nordeste, o extrativismo desses recursos genéticos passa por acelerada erosão genética devido à grande pressão imobiliária na baixada litorânea (Santos, 2010). Desta forma, estudos envolvendo a diversidade e estrutura genética das populações remanescentes de mangabeira são de extrema importância para traçar alternativas de preservação da espécie (Amorim et al., 2015). Além disso, a domesticação e incorporação desta espécie nos sistemas produtivos estão diretamente relacionados ao conhecimento da amplitude e distribuição da variabilidade genética nas populações naturais (Costa et al, 2011).

Uma forma de avaliar a diversidade genética é através dos marcadores moleculares que são definidos como sequências identificáveis de DNA específicas do genoma, e fornecem informações sobre a variabilidade genética, eliminando efeitos ambientais. Pesquisas envolvendo marcadores moleculares para descrever a variabilidade presente em populações naturais de mangabeira são recentes e em número reduzido (Silva et al., 2012b). Entre os diferentes marcadores moleculares, o ISSR (inter-simple sequence repeats) é amplamente utilizado para avaliação da diversidade genética de plantas (Liu et al., 2011). São marcadores dominantes e baseiam-se na amplificação de regiões do DNA através da reação em cadeia polimerase (PCR) e combinam boa parte das vantagens de marcadores de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados microssatélites. São altamente polimórficos, reprodutíveis e não requerem conhecimento prévio sobre o genoma. Além disso, são relativamente baratos (Souza et al., 2004). Os marcadores ISSR são ferramentas importantes para análise da diversidade genética, assim como para a caracterização de acessos e cultivares de diversas espécies.

Morales et al. (2011) avaliaram a divergência genética de 11 cultivares de morango, e descobriram que este tipo de marcador molecular foi eficiente na formação de grupos no estudo da diversidade genética. Dias et al. (2015) utilizaram nove marcadores ISSR em genótipos de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce, e concluíram que estes marcadores foram eficientes na estimativa da variabilidade genética. Marcadores ISSR utilizados em estudo sobre a diversidade genética em *Elaeis guineenses* foram eficientes para detectar a variabilidade genética na espécie (Chagas et al., 2015).

Utilizando marcadores de microssatélites em mangabeira, Amorim et al. (2015) estimou a divergência e estrutura genética das populações naturais no Nordeste brasileiro, e encontrou baixa diversidade genética em populações no estado de Sergipe. Portanto, o objetivo deste estudo foi estimar a variabilidade genética em 10 populações naturais de mangabeira no estado de Sergipe usando marcadores ISSR.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1. Amostras, coleta e extração de DNA

Folhas jovens foram coletadas de 155 indivíduos em 10 populações naturais de mangabeira no estado de Sergipe (Figura 1 e Tabela 1).

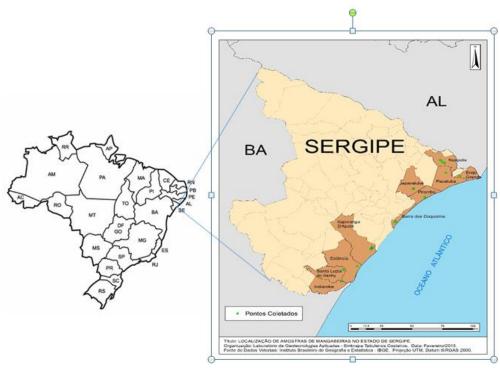


Figura 1. Localização de populações naturais de *Hancornia speciosa* Gomes no estado de Sergipe, Brasil, onde foram coletadas as amostras para análise da estrutura e diversidade genética.

Tabela 1. Identificação, localização geográfica e número de amostras de *Hancornia speciosa* Gomes coletadas em Sergipe, Brasil.

		Nº de	
Populações	Coordenadas geográficas	indivíduos	Código
Itaporanga	11°8'30"S e 37°11'18"W	19	Ita
Pacatuba	10°29'35"S e 36°32'42"W	20	Pac
Indiaroba	11°26'25" e 37°24'30"W	20	Ind
Estância	11°18'20"S e 37°17'42"W	20	Est
Barra dos Coqueiros	10°54'21"S e 37°1'18"W	20	Bc
Pirambu	10°40'15"S e 36°47'27"W	19	Pir
Japaratuba	10°36'52"S e 36°52'10"W	5	Jap
Brejo Grande	10°27'45"S e 36°38'14"W	15	Bg
Neópolis	10°22'19"S e 36°39'22"W	15	Neo
Santa Luzia	11°19'25"S e 37°24'12"W	2	Sant
Total		155	

As folhas de cada indivíduo foram coletadas separadamente, acondicionadas em gelo, para evitar a oxidação. Posteriormente, foram transportadas para o Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju-SE, Brasil. As amostras permaneceram em freezer -80°C até o momento da extração do DNA genômico. A extração de DNA foi realizada usando o método descrito por Doyle e Doyle (1990) modificada por Alzate-Marin et al. (2009). A quantificação do DNA foi feita por espectrofotometria, utilizando Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, EUA). As amostras foram armazenadas a -20°C para uso posterior PCRs.

6.2.2. Amplificação da PCR

Quinze primers ISSR da University of Britsh Columbia, Vancover, Canada foram usados para estimar a diversidade genética dos 155 indivíduos de mangabeira (Tabela 2).

Para a PCR, o volume total da reação foi de $20\mu L$, contendo $2\mu L$ da solução de DNA genômico, $2\mu L$ de cada iniciador com um mix composto de $2\mu L$ de tampão PCR 10X, $0,4\mu L$ de dNTP (10 mM), $0,6\mu L$ de MgCl₂ (50 mM), $0,2\mu L$ de Taq DNA polimerase (5 U/ μL) Invitrogen e $12,8\mu L$ de água ultrapura. Para amplificação das reações, o termociclador (ProFlexTM, Applied Biosystems, USA) foi programado de forma que as amostras foram desnaturadas a $95\,^{\circ}$ C por cinco 5 min, seguidas por 45 ciclos de amplificação. Em cada ciclo, as amostras foram submetidas a desnaturação a $94\,^{\circ}$ C por 1 min, anelamento a diferentes temperaturas por 45s e, finalmente, extensão a $72\,^{\circ}$ C por 2 min.

O resultado da amplificação foi submetido à eletroforese horizontal, em gel de agarose a 2%. Os géis foram colocados em contato em uma solução contendo brometo de etídio (0,5 L/mL de água), por 1 h e visualizados sob luz ultravioleta. Para a mensuração do padrão dos fragmentos, foi utilizado o marcador de peso molecular de 1 Kb, (Promega, Madison, South Dakota, EUA). A visualização dos resultados foi realizada em equipamento de fotodo cumentação Gel doc L pix (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP).

6.2.3 Análise de dados

Os fragmentos de ISSR foram convertidos em matriz binária com base na presença (1) ou ausência (0) do fragmento. Os dados foram importados para o programa TreeView (Page, 1996) e a distribuição da variabilidade genética em cada população foi estimada com base no índice de Shannon (*I*), na heterozigosidade esperada (He) e na análise da variância molecular (AMOVA). O mesmo *software* foi utilizado para estimar distâncias genéticas de acordo com o coeficiente de Jaccard, e os respectivos dendrogramas foram construídos com base no Agrupamento UPGMA.

A consistência do agrupamento foi analisada pela reamostragem bootstrap (10.000 iterações). A análise de coordenadas principais (PCoA) foi realizada usando o *software* GenALEx 6.3 (Peakall e Smouse, 2006), que também foi utilizado para estimar o *I* (Brown e Weir, 1983) e HE (Lynch e Milligan, 1994).

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 15 iniciadores testados, foram amplificados 162 fragmentos com 100% de polimorfismo, revelando alta variabilidade genética entre as populações. Isto pode ser devido à alogamia existente nesta espécie, que apresenta autoincompatibilidade, tornando assim, as plantas derivadas de sementes altamente divergentes entre si em relação à planta-mãe (Darrautl e Schlindwein, 2006). O número de fragmentos variou de cinco (UBC 810) a 22 (UBC 817) (Tabela 2).

Tabela 2. Iniciadores ISSR utilizados em populações naturais de *Hancornia speciosa* Gomes do estado de Sergipe, Brasil, com suas respectivas sequências, temperatura de anelamento (Ta), total de fragmentos (TF), fragmentos polimórficos (FP) e porcentagem de polimorfismo (PPF).

Iniciadores ISSR	Sequência (5ø → 3ø)	Temperatura de anelamento	Total de fragmentos (TF)	Fragmentos polimórficos (FP)	PPF (%)
		(Ta)			
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	50,4°C	7	7	100
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	57,2	12	12	100
UBC 810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	50,4°C	5	5	100
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AT	53°C	7	7	100
UBC 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	54,8	13	13	100
UBC 815	CTC TTC TCT CTC TCT CTG	52,8°C	9	9	100
UBC 816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	54,8	6	6	100
UBC 817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	50,4°C	22	22	100
UBC 818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	57,2	14	14	100
UBC 823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	57,2	6	6	100
UBC 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	54,8	15	15	100
UBC 828	TGT GTG TGT GTG TGT GA	54,8	8	8	100
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGY T	52,8°C	7	7	100
UBC 848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG	53°C	18	18	100
UBC 855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	53°C	13	13	100

Diversos trabalhos com populações naturais apontam para o uso da porcentagem de locos polimórficos como uma medida importante da diversidade genética. Entretanto, apesar de muito usado, percebe-se grande variação nesses valores, como por exemplo, Black-Samuelsson et al. (1997) relataram níveis de polimorfismo muito baixos (cerca de 7%) em *Vícia pisiformis*, enquanto que Brandão et al. (2011) encontraram entre 83 e 89% loci polimórficos em *Myrcia splendem*, utilizando marcadores ISSR. Há variação expressiva nesses percentuais, provavelmente devido às características ecológicas de cada espécie, os diferentes indivíduos e populações amostradas, como também o tipo de marcador utilizado.

A partir de 120 fragmentos ocorreu a estabilização do coeficiente de variação, com valores inferiores a 10%, indicando que os resultados obtidos poderiam ser utilizados para análise da diversidade genética dessas populações (Figura 2). Marcadores baseados em ISSR têm sido utilizados com sucesso nas estimativas de variabilidade genética em espécies silvestres e cultivadas, entre e dentro de populações (Uysal et al., 2010).

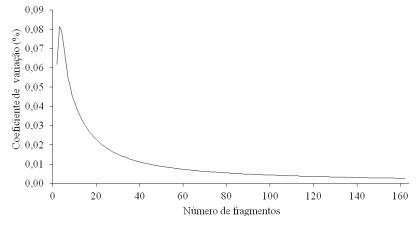


Figura 2. Coeficiente de variação para o número de fragmentos polimórficos utilizando marcadores ISSR entre 10 populações naturais de *Hancornia speciosa* Gomes do estado de Sergipe, Brasil.

O resultado de 100% de polimorfismo foi superior aos relatados na literatura para uso de marcadores moleculares ISSR em *Spondias* sp. em que a porcentagem de polimorfismo alcançou 80% (Santana et al., 2011). Amorim et al. (2013), obtiveram 51 fragmentos, sendo 86% polimórficos, ao realizar a caracterização molecular de mangabeiras nativas utilizando 14 iniciadores ISSR. Diversos trabalhos encontrados na literatura utilizando marcadores dominantes como ISSR, consideram a porcentagem de locos polimórficos como medida de diversidade genética (Lorenzoni et al., 2014).

O valor médio da diversidade genética foi 0,83 e do *I* foi 1,26. Os valores estimados para *I* em cada população variaram de 0,05 (população Pacatuba) a 0,16 (populações de Barra dos Coqueiros e Neópolis) (Tabela 3). Quanto mais próximo de zero for o valor de *I*, menor a diversidade (Souza-Sobreira et al., 2015). Em condições naturais, espera-se que estes valores sejam diferentes de zero. Os genótipos podem incorporar novos alelos por meio de cruzamentos, ou haver perdas em populações pequenas, ou ainda fragmentadas por deriva genética (Barreira et al., 2006). Esses resultados estão de acordo com os relatados por Costa et al. (2011), que obtiveram valores baixos de *I* e He em germoplasma de *Hancornia speciosa* Gomes.

Tabela 3. Número de indivíduos (N), índice de Shannon (I) e heterozigosidade esperada (He) em populações naturais de *Hancornia speciosa* Gomes, obtidos por marcadores ISSR.

Populações	Número de indivíduos	Ι	Не
Itaporanga	19	0,13 (0,02)	0,09 (0,01)
Pacatuba	20	0,09 (0,02)	0,06 (0,01)
Indiaroba	20	0,12 (0,02)	0,08 (0,01)
Estância	20	0,16 (0,02)	0,11 (0,01)
Barra dos Coqueiros	20	0,16 (0,02)	0,1 (0,01)
Pirambu	19	0,14 (0,02)	0,09 (0,01)
Japaratuba	5	0,10 (0,02)	0,07 (0,01)
Brejo Grande	15	0,15 (0,02)	0,10 (0,01)
Neópolis	15	0,16 (0,02)	0,10 (0,01)
Santa Luzia	2	0,05 (0,01)	0,03 (0,01)
Total	155	1,26	0,83

Os índices de diversidade genética utilizados neste estudo (*I* e He) revelaram níveis baixos de diversidade genética nas populações avaliadas. Ao observar os desvios-padrão das estimativas de He, verificou-se que os níveis de diversidade eram semelhantes em todas as populações. A existência de alta diversidade genética entre populações pode ser confirmada quando comparamos os valores de *I* com os de outras espécies arbóreas. Resultados semelhantes foram encontrados por Rivas et al. (2013) e Giustina et al. (2014) em populações naturais de duas espécies alogênicas da floresta amazônica (*Theobroma subincanum* Mart e *Theobroma speciosum* Willd, Ex Spreng), que relataram que houve grande variabilidade genética na interpopulação. No entanto, Amorim et al. (2015), usando marcadores de microssatélites em mangabeira, observaram maior variação dentro das populações (83,18%) do que entre elas (10,82%).

Com base em marcadores ISSR, a matriz de dissimilaridade obtida com 155 indivíduos resultou em 18.769 valores para o índice de dissimilaridade, dos quais 21 valores se destacaram como maiores e menores dissimilaridades (Tabela 4). Os pares formados entre os indivíduos 15x14 (Inxin) e 2x10 (Sxe) estabeleceram a maior (0,996) e menor (0,555) similaridade, respectivamente, e a maioria dos pares com maiores semelhanças pertencem às mesmas populações, e os de menor similaridade pertencem à populações diferentes. O sistema

de reprodução pode influenciar o grau de variabilidade genética, tanto homogeneizando como aumentando a divergência entre indivíduos e populações (Zanella et al, 2012).

Tabela 4. Pares de genótipos com valores extremos de maiores e menores similaridade (s) baseados no índice de Jaccard, para 15 marcadores ISSR em 155 indivíduos de *Hancornia speciosa* Gomes.

Número do							
cruzamento	Maiores similaridades				Menores similaridade		
	Indivíduos	Populações	S	-	Indivíduos	Populações	S
1	7x6	IxI	0,958		5x1	BGxI	0,075
2	11x12	IxI	0,885		13x1	BGxI	0,082
3	12x9	IxI	0,935		10x7	BGxI	0,067
4	3x2	PxP	0,881		2x3	JxI	0,093
5	3x4	PxP	0,968		2X6	JxI	0,086
6	4x2	PxP	0,955		1X6	NExI	0,081
7	2x5	INxIN	0,911		14x7	NExI	0,093
8	3x1	INxIN	0,934		2x13	SxI	0,095
9	15x14	INxIN	0,996		2x17	SxI	0,098
10	1x2	ExE	0,943		2x2	SxIN	0,091
11	1x10	ExIN	0,94		2x5	SxIN	0,086
12	4x14	ExIN	0,875		2x10	SxE	0,055
13	3x7	BCxBC	0,839		2x12	SxE	0,077
14	5x8	BCxBC	0,845		7x3	BGxBC	0,088
15	4x5	JxJ	0,832		13x2	BGxBC	0,09
16	3x4	JxJ	0,821		1x2	IxJ	0,08
17	3x4	BGxJ	0,867		6x1	IxJ	0,092
18	3x2	NExNE	0,87		4x13	IxNE	0,099
19	6x11	NExNE	0,928		6x1	IxNE	0,085
20	15x14	NExS	0,853		6x1	IxBG	0,083
21	14x15	BGxBG	0,846		6x5	IxBG	0,074

Para a espécie em estudo, o sistema de reprodução provavelmente ocasionou alta porcentagem de polimorfismo e, consequentemente, a diversidade genética entre as populações. Resultados contrários foram verificados por Souza-Sobreira et al. (2015), em estudo com diversidade genética de populações naturais de *Pitcairnia flammea* (L.) John (Bromeliácea), em que a menor distância foi encontrada entre indivíduos pertencentes à mesma população e a maior distância em pares originados de populações diferentes.

As relações genéticas entre os indivíduos e as populações foram estimadas por meio de um dendograma, produzido através do coeficiente de similaridade de Jacard e o método UPGMA, que resultou na divisão de cinco grandes grupos (I, II, III, IV e V) e um indivíduo (E10) agrupado isoladamente, que foi o mais divergente entre as populações (Figura 4). Esta distância pode indicar um significativo processo de diferenciação, que é o resultado da erosão genética que estão sujeitos esses indivíduos em áreas de fragmentação no estado de Sergipe

A alta variabilidade genética encontrada em mangabeira pode ser uma consequência da adaptação às mudanças de habitat. As variações causadas por pressões de seleção podem manter o polimorfismo genéticos (Sheng et al., 2004). Outro fator que pode causar alta variabilidade genética nesta espécie é o mecanismo de polinização, que reduz a perda do pólen e impede a autogamia, favorecendo a polinização cruzada (Darrault e Schlindwein, 2005). Luz et al. (2015) concluíram que os marcadores ISSR foram eficientes para detectar a variabilidade genética entre acessos de *Cratylia argentea* (Desv.) Kuntze. Em estudo sobre

diversidade genética de *Cattleya labiata*, os marcadores ISSR foram eficientes para estimar a variabilidade genética da espécie (Pinheiro et al., 2012).

Para a análise de coordenadas principais (ACoP) (Figura 3), os dados de similaridade estão em conformidade com o ACoP. Foram identificados quatro grupos entre as diferentes populações, e os dois primeiros componentes principais explicaram 67,77% da variação. Este resultado confirma a eficácia dos marcadores ISSR e a existência de diversidade genética entre as populações estudadas. Ao analisar conjuntamente as informações entre o agrupamento UPGMA e a ACoP, verificou-se que o indivíduo E10 foi o mais divergente, por está isolado em relação aos outros agrupamentos. O uso de mais de um método de agrupamento, devido a diferenças no ranking, otimização e classificação dos grupos, permite que a classificação seja complementada pelos critérios que cada técnica usa, e impede que inferências errôneas sejam adotadas na alocação de materiais, dentro de um determinado genótipo subgrupo (Silva et al., 2012a).

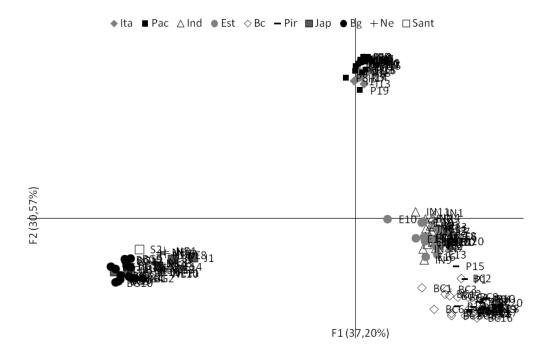


Figura 3. Análise de coordenadas principais (ACoP) para populações nativas de *Hancornia speciosa* Gomes do estado de Sergipe, Brasil.

Os resultados obtidos pela análise de variância molecular (AMOVA) (Tabela 5), indicaram que a maior parte da diversidade genética (77%) encontra-se entre as populações, enquanto que 23 % estão distribuídas dentro das populações. Resultados contrários foram verificados por Jimenez et al. (2015) em estudo com populações naturais de mangabeiras.

Tabela 5. Análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro das 10 populações de *Hancornia speciosa* Gomes no estado de Sergipe, Brasil.

Fonte da Variação	GL	SQ	QM	Componente da variância (CV)	Total (%)
Entre Populações	9	2751,4	305,7	19,8	77%
Dentro das Populações	144	847,3	5,9	5,9	23%
Total	153	3598,7		25,7	100%

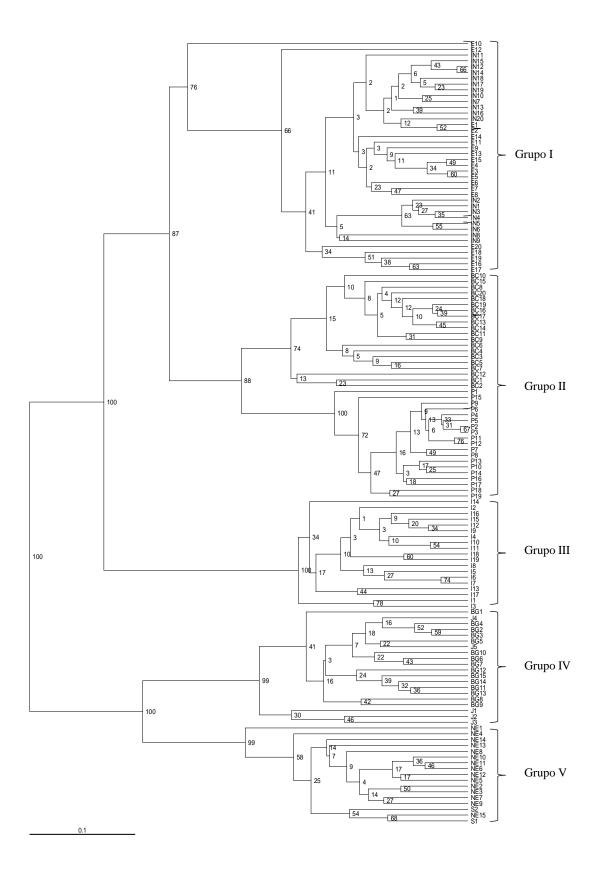


Figura 4. Representação filogenética pelo agrupamento UPGMA, similaridade genética pelo coeficiente de Jaccard (1908) e análise õbootstrapö (10.000x) para 10 populações naturais de *Hancornia speciosa* Gomes do estado de Sergipe, Brasil.

Existe grande variação genética dentro das populações de espécies arbóreas com sistemas reprodutivos e dispersão eficiente de pólen e sementes (Yun et al., 1998), que resultam em fluxo alélico de longa distância e diminui a variação entre populações e aumenta dentro delas (Loveless e Hanrick, 1984). Nas populações de mangabeira avaliadas, o fluxo gênico pode ser restrito, e assim, a diversidade intrapopulacional é menor, sendo maior entre as populações.

A estrutura genética de populações de plantas reflete as interações de muitos processos diferentes, tais como a fragmentação do habitat, e/ou isolamento da população, mudanças na distribuição, mutação, ecologia, isolamento reprodutivo, deriva genética, mecanismo de acasalamento, o fluxo gênico e seleção (Thendral Hepsibha et al., 2010). A diversidade genética contribui grandemente para a sustentabilidade das populações de plantas (Wang et al., 2007) e seu estudo é necessário para compreender o que ocorre na população (Silva et al., 2012b).

A mangabeira é uma espécie ameaçada de extinção no Nordeste brasileiro, no estado de Sergipe, e vem enfrentando elevada ação antrópica e esse fator compromete a sobrevivência desta espécie que faz parte de um contexto social e econômico no referido estado. A fragmentação do habitat causou a principal limitação deste estudo, sendo difícil coletar um grande número de indivíduos em algumas populações. Estudos que possibilitem investigar a distribuição e a composição genética são de grande importância para a conservação e melhoramento desta espécie. Uma boa estratégia para conservação efetiva da variabilidade genética desses recursos genéticos seria a preservação de várias populações ao longo da distribuição geográfica da espécie. Essa tentativa vem sendo realizada com algumas ações pontuais, como a manutenção de bancos de germoplasma de mangaba e a criação de reservas particulares do patrimônio natural. Em Sergipe, fica localizado o BAG Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros e há 1.232,30 hectares distribuídos em seis RPPNs, sendo a maior delas, a do õCajuö, localizada em Itaporanga d'Ajuda, com 763,37 ha (ICMBIO, 2016).

Os marcadores ISSR utilizados neste estudo foram eficazes na estimativa da variabilidade genética entre populações de mangabeira e o alto grau de polimorfismo detectado sugere que a diversidade genética de populações remanescentes no estado de Sergipe pode fornecer informações importantes para a conservação e futuro melhoramento desta espécie.

6.4. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa de Doutorado Sanduíche concedida a Soares, A.N.R. (processo # 203542 / 2014-2) e a Embrapa Tabuleiros Costeiros pelo suporte neste estudo.

6.5. REFERÊNCIAS

Alzate-Marin AL, Guidugli MC, Soriani HH, Martinez CA, et al. (2009). An efficient and rapid DNA minipreparation procedure suitable for PCR/SSR and RAPD analyses in tropical forest tree species. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 5: 1217-1224. http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132009000500020

Amorim JAE, Silva AVC, Vitória MF and Ramos SR (2013). Diversidade genética de indivíduos de mangabeira oriundos do povoado Abaís, em Sergipe. Anais do 7° Congresso Brasileiro de Melhoramento Vegetal, Uberlândia. Available at [http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/91073/1/diversidade-genetic-mangabeira-SE.pdf]

Amorim JAE, Mata LR, Lédo AS, Azevedo VCR, et al. (2015). Diversity and genetic structure of mangaba remnants in states of northeastern Brazil. *Genet. Mol. Res.* 14: 823-833. http://dx.doi.org/10.4238/2015.February.2.7

- Barreira S, Sebbenn AM, Scolforo JRS and Kageyama PY (2006). Diversidade genética sistema de reprodução em população nativa de *Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac Leish sob exploração. *Sci. Forest.* 71: 119-130.
- Barros DI, Bruno RLA, Nunes HV, Silva GC, et al. (2006). Different extraction methods aiming mangaba seeds quality. *Rev. Bras. Frutic.* 28: 25-27. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452006000100010
- Black-Samuelsson S, Eriksson G, Gustafsson L and Gustafsson P (1997). RAPD and morphological analysis of the rare plant species *Vicia pisiformis* (Fabaceae). *Biol. J. Linn. Soc.* 61: 325-343.
- Brandão MM, Vieira FA and Carvalho D (2011). Fine-scale genetic structure of *Myrcia splendens* (Myrtaceae). *Rev. Árvore* 35: 957-964.
- Brown AHD and Weir BS (1983). Measuring genetic variability in plant populations. In: Isozymes in plant genetics and breeding, part A (Tanksley SD and Orton TJ, eds.). Elsevier, Amsterdam, 219-239.
- Chagas KPT, Sousa RF, Farjado CG and Vieria FA (2015). Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineensis. Rev. Bras. Cien. Agr.* 10: 147-152.
- Costa TS, Silva AVC, Lédo AS, Santos ARF, et al. (2011). Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. *Pesq. Agropec. Bras.* 46: 499-508. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011000500007
- Darrault RO and Schlindwein C (2005). Limited fruit production in *Hancornia speciosa* (Apocynaceae) and pollination by nocturnal and diurnal insects with long mouth parts. *Biotropica* 37: 381-388. http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7429.2005.00050.x
- Darrault RO and Schlindwein C (2006). Polinização. In: A cultura da mangabeira (Silva Junior JF and Ledo AS, Org.). Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, 43-56.
- Dias FTC, Bertini CHCM, Silva APM and Cavalcanti JJV (2015). Variabilidade genética de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce analisada por marcadores RAPD e ISSR. *Rer. Cien. Agr.* 46: 563-572.
- Doyle JJ and Doyle JL (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
- Ganga RMD, Ferreira GA, Chaves LJ and Naves RV (2010). Caracterização de frutos e árvores de populações naturais de *Hancornia speciosa* Gomes do cerrado. *Rev. Bras. Frutc.* 32: 101-113. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452010005000019
- Giustina LD, Luz LN, Vieira FS, Rossi FS, et al. (2014). Population structure and genetic diversity in natural populations of *Theobroma speciosum* Willd. Ex Spreng. (Malvaceae). *Genet. Mol. Res.* 13: 3510-3519. http://dx.doi.org/10.4238/2014.February.14.5
- ICMBIO (Instituto Chico Mendes MMA) (2016). Reservas particulares do patrimônio natural, RPPN, Sergipe. ICMBIO, Brazil. http://sistemas.icmbio.gov.br/simrppn/publico/detalhe/763/.
- Jaccard P (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Societé Vanddoise des Sciences Natur. 44: 223-270.
- Jimenez HJ, Martins LSS, Montarroyos AVV, Silva Junior JF, et al. (2015). Genetic diversity of the neotropical tree *Hancornia speciosa* Gomes in natural populations in northeastern Brazil. *Genet. Mol. Res.* 14: 17749-17757. http://dx.doi.org/10.4238/2015.December.21.48
- Liu D, He X, Liu G and Huang B (2011). Genetic diversity and phylogenetic relationship of Tadehagi in southwest China evaluated by inter-simple sequence repeat (ISSR). *Genet. Res. Crop Evol.* 58: 679-688. http://dx.doi.org/10.1007/s10722-010-9611-3
- Lorenzoni RM, Soares TCB, Santiago VF, Silva JA, et al. (2014). Utilização de marcadores ISSR na avaliação da divergência genética entre acessos de biribazeiro. *Rev. Bras. Frutic.36*: 251-257. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452014000500029

- Loveless MD and Hamrick JL (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 15: 65-95. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.es.15.110184.000433
- Luz GA, Gomes SO, Araujo Neto RB, Nascimento MSCB, et al. (2015). Molecular characterization of accessions of *Cratylia argentea* (Camaratuba) using ISSR markers. *Genet. Mol. Res.* 14: 15242-15248. http://dx.doi.org/10.4238/2015.November.25.12
- Lynch M and Milligan BG (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.* 3: 91-99. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.1994.tb00109.x
- Morales RGF, Resende JTV, Faria MV, Silva PR, et al. (2011). Divergência genética em cultivares de morangueiro, baseada em caracteres morfoagronômicos. *Rev. Ceres* 3: 323-329. http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2011000300012
- Page RDM (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12: 357-358.
- Peakall R and Smouse PE (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6: 288-295 http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
- Pinheiro LR, Rabbani ARC, Silva AVC, Lédo AS, et al. (2012). Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. *Plant Syst. Evol.* 298: 1815-1825. http://dx.doi.org/10.1007/s00606-012-0682-9
- Rivas LH, Giustina LD, Luz LN, Karsburg IV, et al. (2013). Genetic diversity in natural populations of *Theobroma subincanum* Mart. in the Brazilian Amazon. *Genet. Mol. Res.* 12: 4998-5006. http://dx.doi.org/10.4238/2013. October.24.12
- Santana IBB, Oliveira EJ, Soares-Filho WS, Ritzinger R, et al. (2011). Variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. *Rev. Bras. Frutic.* 33: 868-876. http://dx.doi.org/10.1590/S0100- 29452011005000090
- Santos PCG, Alves EU, Guedes RS, Silva KB, et al. (2010). Quality of *Hancornia speciosa* Gomes seeds in function of drying periods. *Semina: Cienc. Agric.* 31: 343-352.
- Sheng Y, Zheng WH, Pei KQ and Ma KP (2004). Population genetic structure of a dominant desert tree, *Haloxylon ammodendron* (Chenopodiaceae), in the southeast Gurbantunggut Desert detected by RAPD and ISSR markers. *Acta Bot. Sin.* 46: 675-681.
- Silva AVC, Santos ARF, Lédo AS, Feitosa RB, et al. (2012a). Moringa genetic diversity from Germplasm Bank using RAPD markers. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 15: 31-39.
- Silva AVC, Rabbani ARC, Sena-Filho JG, Almeida CS, et al. (2012b). Genetic diversity analysis of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), an exotic Brazilian tropical species. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 15: 217-225.
- Souza LMFI, Kageyama PY and Sebbenn AM (2004). Estrutura genética em populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* St. Hil (Bombacaceae). *Sci. Forest.* 65: 70-79.
- Souza-Sobreira FB, Souza GB, Rosado CCG, Miranda FD, et al. (2015). Genetic diversity in three natural populations of *Pitcairnia flammea* (l.) John (Bromeliaceae) estimated by ISSR markers. *Genet. Mol. Res.* 14: 15892-15901. http://dx.doi.org/10.4238/2015.December.3.1
- Thendral Hepsibha B, Premalakshmi V and Sekar T (2010). Genetic diversity in *Azima tetracantha* (Lam) assessed through RAPD analysis. *Indian J. Sci. Technol.* 3: 170-173.
- Uysal H, Yong-Bi F, Kurt O, Peterson GW, et al. (2010). Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) as revealed by ISSR markers. *Genet. Res. Crop Evol.* 57: 1109-1119. http://dx.doi.org/10.1007/s10722-010-9551-y
- Wang W, Chen L, Yang P, Hou L, et al. (2007). Assessing genetic diversity of populations of top mouth culter (*Culteral burnus*) in China using AFLP markers. *Biochem. Syst. Ecol.* 35: 662-669. http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2007.04.008

- Yun R, Zhong M, Wang H-X, Wei W, et al. (1998). Study on DNA diversity of Liaodong oak population at Dongling Mountain Region, Beijing. *Acta Bot. Sin.* 40: 169-175.
- Zanella CM, Janke A, Palma-Silva C, Kaltchuk-Santos E, et al. (2012). Genetics, evolution and conservation of Bromeliaceae. *Genet. Mol. Biol.* 35: 1020-1026. http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572012000600017

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A variabilidade genética existente na mangabeira foi evidenciada em todos os experimentos desenvolvidos.

Houve um avanço no conhecimento sobre os aspectos de propagação, considerado um dos principais gargalos do sistema de produção da mangaba. Além disso, foi realizado o primeiro estudo com progênies de mangabeira. Esses resultados irão orientar estratégias de conservação, seleção e melhoramento.

Com o conhecimento da diversidade genética das populações naturais de mangabeira em Sergipe, foi possível coletar novos acessos e ver *in situ* a diminuição e em alguns casos, o desaparecimento de algumas áreas de ocorrência natural.

É necessário dar continuidade às pesquisas, visando o aumento da vida útil do fruto, produção de mudas de forma mais acelerada, desenvolvimento de variedades, conservação e melhoramento desses recursos genéticos.

ANEXOS

Carta de submissão ó Artigo 2

Biodiversity and Conservation

Genetic diversity of accessessions and first generation progeny of the mangaba genebank --Manuscript Draft--

Manuscript Number:				
Full Title:	Genetic diversity of accessessions and first generation progeny of the mangaba genebank			
Article Type:	Original Research			
Keywords:	Hancornia speciosa Gomes; Brazilian fruits; genetic resources			
Corresponding Author:	Ana Veruska Cruz Silva, PhD Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, BRAZIL			
Corresponding Author Secondary Information:				
Corresponding Author's Institution:	Embrapa Tabuleiros Costeiros			
Corresponding Author's Secondary Institution:				
First Author:	Ana Veruska Cruz Silva, PhD			
First Author Secondary Information:				
Order of Authors:	Ana Veruska Cruz Silva, PhD			
	Adrielle Naiana Ribeiro Soares			
	Debora Clivati			
	Matthew Gitzendanner			
	Pamela Soltis			
	Douglas Soltis			
Order of Authors Secondary Information:				
Funding Information:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (203542/2014-2)	Dr Ana Veruska Cruz Silva		
	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (9461020/2014-9)	MSc Adrielle Naiana Ribeiro Soares		
Abstract:	Mangaba (Hancornia speciosa Gomes) is an important fruit tree in Brazil and has an unexplored stock germplasm collections. Commercial varieties are unavailable and little is known about its potential as a source of genetic diversity for molecular breeding programs. Progeny tests may improve studies on commercial variability and facilitate genetic improvement of the species. Our aim was to evaluate the genetic diversity and structure of mangaba accessions and progeny from the active germplasm bank. We estimated the genetic diversity of 96 mangaba samples from the Mangaba Genebank using 4 SSR markers. The mean observed heterozygosity was lower than expected, showing an excess of homozygotes, corroborated by the positive coefficient of endogamy. The genetic diversity indexes (Fst) and Nei's unbiased genetic identity (GI) revealed, in general, moderate genetic diversity between accessions. The relationship between matrices and progenies showed that the highest degree of inherited genetic information was between ABP1 and ABP2. The Bayesian analysis suggested the presence of two distinct groups of genotypes (K=2). These results will assist future breeding programs and facilitate the conservation of Hancornia speciosa.			
Suggested Reviewers:	Ana Ledo Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria ana.ledo@embrapa.br			

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Area

Rosa Baribieri

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria lia.barbieri@embrapa.br

Arie Blank Universidade Federal de Sergipe

arie.blank@gmail.com

Tatiana Costa Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria tatianaitase@gmail.com



Genetic diversity in natural populations of mangaba in Sergipe, the largest producer State in Brazil

A.N.R. Soares¹, M.F. Vitória¹, A.L.S. Nascimento², A.S. Ledo², A.R.C. Rabbani³ and A.V.C. Silva²

¹Graduate Program in Agriculture and Biodiversity, Federal University of Sergipe, Aracaju, SE, Brasil ²Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, Brasil ³Instituto Federal da Bahia, Porto Seguro, BA, Brasil

Corresponding author: A.V.C. Silva E-mail: ana.veruska@embrapa.br

Genet. Mol. Res. 15 (3): gmr.15038624 Received March 21, 2016 Accepted April 25, 2016 Published August 18, 2016 DOI http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15038624

Copyright © 2016 The Authors. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution ShareAlike (CC BY-SA) 4.0 License.

ABSTRACT. Mangaba (Hancornia speciosa Gomes) is found in areas of coastal tablelands in the Brazilian Northeast and Cerrado regions. This species has been subjected to habitat fragmentation that is mainly due to human activity, and requires conservation strategies. The aim of this study was to analyze the structure and inter- and intrapopulation genetic diversity of natural populations of H. speciosa Gomes using inter-simple sequence repeat (ISSR) molecular markers. A total of 155 individuals were sampled in 10 natural populations (ITA, PAC, IND, EST, BC, PIR, JAP, BG, NEO, and SANT) in the State of Sergipe, Brazil. Fifteen primers were used to generate 162 fragments with 100% polymorphism. Genetic analysis showed that the variability between populations (77%) was higher than within populations (23%). It was

possible to identify five different groups by the unweighted pair group method with arithmetic mean and principal coordinate analysis, and only one individual (E10) remained isolated. Using ISSR markers it was possible to obtain a molecular profile of the populations evaluated, showing that these markers were effective and exhibited sufficient polymorphism to estimate the genetic variability of natural populations of *H. speciosa* Gomes.

Key words: Genetic variability; Hancornia speciosa Gomes;

ISSR marker; Species preservation

INTRODUCTION

Mangaba (Hancornia speciosa Gomes, Apocynaceae) is a fruit tree species that is native to Brazil, and has social, economic, and cultural importance in the areas where it occurs. Sergipe State is the largest producer of this fruit, which is found in natural populations and is exploited almost entirely in an extractive way.

The fruit of this plant is popular due to its organoleptic characteristics and high nutritional value, being rich in the vitamins A, B1, B2, and C, as well as phosphorus, calcium, and proteins (Barros et al., 2006). Its pulp is the main product, and it is consumed *in natura* or as raw material for the manufacture of products such as jam, ice cream, juice, jelly, sauce, wine, and vinegar (Costa et al., 2011). Consequently, the species has aroused the interest of the industry and trade sectors (Ganga et al., 2010).

In the Brazilian Northeast, the extraction of genetic resources undergoes accelerated genetic erosion due to large real estate pressure on the coastal lowlands (Santos et al., 2010). Therefore, studies on the genetic diversity and structure of the remaining populations of mangaba are extremely important, in order to find alternatives for the species' preservation (Amorim et al., 2015). In addition, the domestication and incorporation of this species into production systems is directly related to knowledge of the range and distribution of genetic variability in natural populations (Costa et al., 2011).

One way of evaluating genetic diversity is by using molecular markers, which are defined as DNA-identifiable sequences specific to the genome, and provide information on genetic variability by eliminating environmental effects. Few studies have used molecular markers to describe this variability in natural populations of mangaba (Silva et al., 2012b). Among the different molecular markers, inter-simple sequence repeats (ISSRs) are widely used to assess genetic diversity in plants (Liu et al., 2011). They are dominant markers, are based on the amplification of DNA regions by polymerase chain reaction (PCR), and combine many of the advantages of amplified fragment length polymorphism markers and microsatellites. They are highly polymorphic, reproducible, and do not require prior knowledge of the genome. Moreover, they are relatively cheap (Souza et al., 2004). ISSR markers are important tools for the analysis of genetic diversity, as well as for the characterization of accessions and cultivars of several species.

Morales et al. (2011) evaluated the genetic divergence of 11 strawberry cultivars, and found that this type of molecular marker is effective in the formation of groups in the study of genetic diversity. Dias et al. (2015) used nine ISSR markers in early and erect cowpea genotypes, and concluded that these markers were effective in estimating genetic variability.

ISSRs used in a study on the genetic diversity of *Elaeis guineensis* were effective in detecting genetic variability in this species (Chagas et al., 2015).

Using microsatellite markers in mangaba, Amorim et al. (2015) estimated the divergence and genetic structure of natural populations in the Brazilian Northeast, and found low genetic diversity in populations in Sergipe State. Therefore, the objective of this study was to estimate genetic variability in 10 natural populations of mangaba in the State of Sergipe using ISSR markers.

MATERIAL AND METHODS

Sampling, collection, and DNA extraction

Young leaves were collected from 155 individuals in 10 natural populations of mangaba in the State of Sergipe (Figure 1 and Table 1).



Figure 1. Location of natural populations of *Hancornia speciosa* Gomes in the State of Sergipe, Brazil, where samples were collected for the analysis of structure and genetic diversity.

Table 1. Identification, geographical location, and number of *Hancornia speciosa* Gomes samples collected in Sergipe, Brazil.

Population	Geographical coordinates	No. of individuals	Code
Itaporanga	11°8'30"S and 37°11'18"W	19	Ita
Pacatuba	10°29'35"S and 36°32'42"W	20	Pac
Indiaroba	11°26'25"S and 37°24'30"W	20	Ind
Estância	11°18'20"S and 37°17'42"W	20	Est
Barra dos Coqueiros	10°54'21"S and 37°1'18"W	20	Bc
Pirambu	10°40'15"S and 36°47'27"W	19	Pir
Japaratuba	10°36'52"S and 36°52'10"W	5	Jap
Brejo Grande	10°27'45"S and 36°38'14"W	15	Bg
Neópolis	10°22'19"S and 36°39'22"W	15	Neo
Santa Luzia	11°19'25"S and 37°24'12"W	2	Sant
Total		155	

Genetics and Molecular Research 15 (3): gmr.15038624

Leaves of each individual were collected separately, and were ice-packed in order to prevent oxidation. Subsequently, they were transported to the Molecular Biology Laboratory of Embrapa Coastal Tablelands, Aracaju, SE, Brazil. Samples remained in the freezer at -80°C until genomic DNA extraction. DNA extraction was conducted using the method described by Doyle and Doyle (1990) and modified by Alzate-Marin et al. (2009). DNA quantification was performed using a NanoDropTM 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). Samples were stored at -20°C for subsequent use in PCRs.

PCR amplification

Fifteen ISSR primers obtained from the University of British Columbia, Vancouver, Canada, were used to estimate the genetic diversity of the 155 mangaba individuals (Table 2).

For the PCR, the total volume of the reaction was 20 μL, which contained 2 μL genomic DNA solution, 2 μL of each primer with a compound mix of 2 μL 10X PCR buffer, 0.4 μL dNTP (10 mM), 0.6 μL MgCl₂ (50 mM), 0.2 μL Taq DNA polymerase (5 U/μL; Invitrogen), and 12.8 μL ultrapure water. For reaction amplification, the thermal cycler (ProFlexTM, Applied Biosystems, USA) was programmed so that the samples were denatured at 95°C for 5 min followed by 45 amplification cycles. At each cycle, the samples underwent denaturation at 94°C for 1 min, annealing at different temperatures for 45 s, and a final extension at 72°C for 2 min.

The result of the amplification was subjected to horizontal electrophoresis on 2% agarose gels. The gels were then placed in contact in a solution containing ethidium bromide (0.5 μ L/mL water) for 1 h, and visualized under ultraviolet light. For the measurement of fragment patterns, we used a 1-kb molecular weight marker (Promega, Madison, SD, USA). Visualization of the results was conducted using a Gel Doc L-Pix photodocumentation device (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, Brazil).

Data analysis

The ISSR fragments were converted into a binary matrix based on the presence (1) or absence (0) of fragments. Data were imported into the TreeView software (Page, 1996), and the distribution of genetic variability in each population was estimated based on the Shannon index (I), the expected heterozygosity $(H_{\rm E})$, and analysis of molecular variance (AMOVA). The same software was used to estimate genetic distances according to the Jaccard coefficient, and the respective dendrograms were constructed based on the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA).

The consistency of the clustering was analyzed by bootstrap resampling (10,000 iterations). Principal coordinates analysis (PCoA) was conducted using the GenALEx 6.3 software (Peakall and Smouse, 2006), which was also used to estimate I (Brown and Weir, 1983) and $H_{\rm E}$ (Lynch and Milligan, 1994).

RESULTS AND DISCUSSION

Of the 15 primers tested, 162 fragments were amplified with 100% polymorphism, showing high genetic variability between the populations. This may have been due to the allogamy of this species that results in self-incompatibility, and thus makes plants derived

from seeds highly divergent from each other in relation to the parent plant (Darrault and Schlindwein, 2006). The number of fragments ranged from five (UBC 810) to 22 (UBC 817) (Table 2).

Table 2. Inter-simple sequence repeat (ISSR) primers used in natural populations of Hancornia speciosa Gomes from the State of Sergipe, Brazil, with their respective sequences, annealing temperatures, total fragments, polymorphic fragments, and polymorphism percentages (PP).

ISSR primer	Sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Total fragments	Polymorphic fragments	PP (%)
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	50.4	7	7	100
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	57.2	12	12	100
UBC \$10	GAG AGA GAG AGA GAG AT	50.4	5	5	100
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AT	53.0	7	7	100
UBC 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	54.8	13	13	100
UBC 815	CTC TTC TCT CTC TCT CTG	52.8	9	9	100
UBC 816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	54.8	6	6	100
UBC 817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	50.4	22	22	100
UBC 818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	57.2	14	14	100
UBC 823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	57.2	6	6	100
UBC 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	54.8	15	15	100
UBC 828	TGT GTG TGT GTG TGT GA	54.8	8	8	100
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGY T	52.8	7	7	100
UBC 848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG	53.0	18	18	100
UBC 855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	53.0	13	13	100

Several studies on natural populations use the percentage of polymorphic loci as an important measure of genetic diversity. However, although it is widely used, wide variations in this value are found, e.g., Black-Samuelsson et al. (1997) reported very low polymorphism levels (around 7%) in Vicia pisiformis, whereas Brandão et al. (2011) found between 83 and 89% polymorphic loci in Myrcia splendensm using ISSR markers. There is significant variation in these percentages, probably due to the ecological characteristics of each species, the different individuals and populations sampled, and the type of marker used.

Coefficient of variation stabilization occurred in 120 fragments, with values lower than 10%, indicating that the results could be used to analyze the genetic diversity of these populations (Figure 2). Markers based on ISSR have been successfully used in estimating genetic variability in wild and cultivated species, both between and within populations (Uysal et al., 2010).

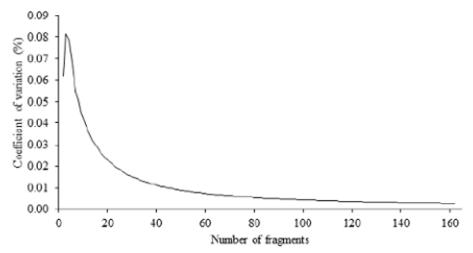


Figure 2. Coefficient of variation for the number of polymorphic fragments using ISSR markers among 10 natural populations of Hancornia speciosa Gomes of the State of Sergipe, Brazil.

Genetics and Molecular Research 15 (3): gmr.15038624

The 100% polymorphism value that we obtained was higher than that reported in the literature for the use of ISSR molecular markers in *Spondias* sp, in which the polymorphism percentage was reported to be 80% (Santana et al., 2011). Amorim et al. (2013) obtained 51 fragments, 86% being polymorphic, when conducting the molecular characterization of native mangaba using 14 ISSR primers. Several studies that have used dominant markers, such as ISSRs, consider the percentage of polymorphic loci as a genetic diversity measure (Lorenzoni et al., 2014).

The mean genetic diversity value was 0.83 and the mean I value was 1.26. Estimated values for I within each population ranged from 0.05 (Pacatuba population) to 0.16 (Barra dos Coqueiros and Neópolis populations) (Table 3). The closer to zero is the value of I, the lower is the diversity (Souza-Sobreira et al., 2015). Under natural conditions, it is expected that these values are different from zero. Genotypes may incorporate new alleles by crossing, losses in small populations, or in populations fragmented by genetic drift (Barreira et al., 2006). These results agree with those reported by Costa et al. (2011), who obtained low values of I and $H_{\rm E}$ in H. speciosa Gomes germplasm.

Table 3. Number of individuals, Shannon index (I), and expected heterozygosity ($H_{\rm E}$) in natural populations of *Hancornia speciosa* Gomes obtained by inter-simple sequence repeat markers.

Population	No. of individuals	I	H _Z
Itaporanga	19	0.13	0.09
Pacatuba	20	0.09	0.06
Indiaroba	20	0.12	0.08
Estáncia	20	0.16	0.11
Barra dos Coqueiros	20	0.16	0.1
Pirambu	19	0.14	0.09
Japaratuba	5	0.10	0.07
Brejo Grande	15	0.15	0.10
Neópolis	15	0.16	0.10
Santa Luzia	2	0.05	0.03
Total	155	1.26	0.83

The genetic diversity indices used in this study (I and $H_{\rm E}$) revealed low levels of genetic diversity within the populations evaluated. By observing the standard deviations of the $H_{\rm E}$ estimates, it was noted that the diversity levels were similar in all of the populations. The existence of high genetic diversity among populations can be confirmed when comparing values of I with those of other tree species. Similar results were found by Rivas et al. (2013) and Giustina et al. (2014) in natural populations of two allogamous species of the Amazon forest (*Theobroma subincanum* Mart. and *Theobroma speciosum* Willd. Ex Spreng.), who reported that there was great interpopulation genetic variability. However, Amorim et al. (2015), using microsatellite markers in mangaba, observed greater variation within populations (83.18%) than between them (10.82%).

Based on the ISSR markers, the similarity matrix obtained from the 155 individuals resulted in 18,769 values for the dissimilarity index, 21 of which stood out as having the highest and lowest dissimilarities (Table 4). The pairs formed between the individuals 15 x 14 (IN x IN) and 2 x 10 (S x E) had the highest (0.996) and lowest (0.555) similarities, respectively, and most pairs with the highest similarities belonged to the same populations and those with the lowest belonged to different populations. The reproductive system can influence the degree of genetic variability by both homogenizing and increasing divergence between individuals and populations (Zanella et al., 2012).

Table 4. Pairs of genotypes that had extreme values of high and low similarity (s) based on the Jaccard coefficie	nt
from 15 inter-simple sequence repeat markers in 155 individuals of Hancornia speciosa Gomes.	

Order		Highest similarity		Lowest similarity			
	Individuals	Populations	\$	Individuals	Populations	5	
l	7 x 6	IxI	0.958	5 x 1	BGxI	0.075	
2	11 x 12	IxI	0.885	13 x 1	BGxI	0.082	
3	12 x 9	IxI	0.935	10 x 7	BGxI	0.067	
4	3 x 2	PxP	0.881	2 x 3	JxI	0.093	
5	3 x 4	PxP	0.968	2 x 6	JxI	0.086	
6	4 x 2	PxP	0.955	1 x 6	NE x I	0.081	
7	2 x 5	IN x IN	0.911	14 x 7	NE x I	0.093	
8	3 x 1	IN x IN	0.934	2 x 13	SxI	0.095	
9	15 x 14	IN x IN	0.996	2 x 17	SxI	0.098	
10	1 x 2	ExE	0.943	2 x 2	SxIN	0.091	
11	1 x 10	ExIN	0.94	2 x 5	SxIN	0.086	
12	4 x 14	ExIN	0.875	2 x 10	SxE	0.055	
13	3 x 7	BC x BC	0.839	2 x 12	SxE	0.077	
14	5 x 8	BC x BC	0.845	7 x 3	BG x BC	0.088	
15	4 x 5	JxJ	0.832	13 x 2	BG x BC	0.09	
16	3 x 4	JxJ	0.821	1 x 2	IxJ	0.08	
17	3 x 4	BG x J	0.867	6 x 1	IxJ	0.092	
18	3 x 2	NE x NE	0.87	4 x 13	I x NE	0.099	
19	6 x 11	NE x NE	0.928	6 x 1	I x NE	0.085	
20	15 x 14	NE x S	0.853	6 x 1	I x BG	0.083	
21	14 x 15	BG x BG	0.846	6 x 5	I x BG	0.074	

For the species under study, the reproductive system probably caused the high polymorphism percentage, and consequently the high genetic diversity observed among the populations. Contrary results were obtained by Souza-Sobreira et al. (2015) in a study on the genetic diversity of natural populations of Pitcairnia flammea (L.) John (Bromeliaceae), who reported that the shortest distance was among individuals from the same population and the greatest distance was among populations.

Genetic relationships between individuals and populations were estimated based on a dendrogram produced by the Jaccard coefficient and the UPGMA, which resulted in five large clusters (I, II, III, IV, and V) and one individual (E10) that was clustered separately, which was the most divergent among the populations (Figure 3). This distance may indicate a significant differentiation process, which is the result of the genetic erosion that these individuals are subjected to in fragmented habitats in Sergipe State.

The high genetic variability found in mangaba may be a consequence of adaptation to habitat change; variation caused by selection pressure can maintain genetic polymorphisms (Sheng et al., 2004). Another factor that may cause high genetic variability in this species is the pollination mechanism it possesses, which reduces the loss of pollen, prevents autogamy, and favors cross-pollination (Darrault and Schlindwein, 2005). Luz et al. (2015) concluded that ISSR markers are effective in detecting genetic variability among Cratylia argentea (Desv.) Kuntze accessions. In a study on the genetic diversity of Cattleva labiata, ISSR markers effectively estimated the genetic variability of this species (Pinheiro et al., 2012).

The similarity data were in accordance with the PCoA results (Figure 4). Four groups were identified among the different populations, and the first two principal components explained 67.77% of the variation. This result confirms the effectiveness of ISSR markers and the existence of genetic diversity among the populations studied. A joint analysis of the UPGMA clustering and PCoA results revealed that individual E10 was the most divergent

because it was isolated from the other groups. Because of differences in ranking, optimization, and cluster classification, the use of more than one clustering method allows the classification to be complemented by the criteria that each technique uses, and prevents the adoption of erroneous inferences in the allocation of materials within a certain genotype subcluster (Silva et al., 2012a).

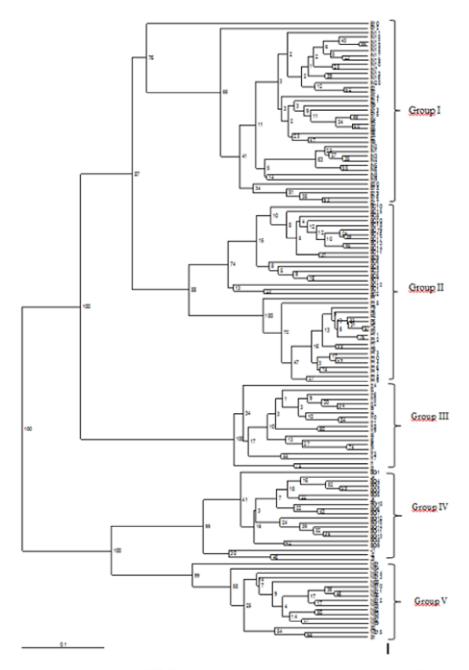


Figure 3. Phylogenetic representation by the UPGMA clustering method, genetic similarity by the Jacard coefficient (1908), and bootstrap analysis (10,000X) for 10 natural populations of Hancornia speciosa Gomes of the State of Sergipe, Brazil.



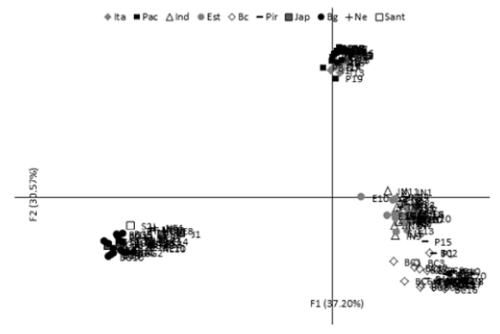


Figure 4. Principal coordinates analysis (PCoA) for natural populations of *Hancornia speciosa* Gomes of the State of Sergipe, Brazil.

Table 5 shows the results obtained by AMOVA, which indicate that most of the genetic diversity (77%) was found between populations while 23% was within populations. Contrary results were found by Jimenez et al. (2015) in a study on natural mangaba populations.

T	able 5. Analysis o	of molecular	variance b	between an	d within	10 populations	of Hancornia	speciosa (jomes in
tl	e State of Sergipe	, Brazil.							

Source of variation	df.	SS	MS	Variance components (CV)	Total (%)
Among populations	9	2751.4	305.7	19.8	77
Within populations	144	847.3	5.9	5.9	23
Total	153	3598.7		25.7	100

d.f. - degrees of freedom; SS - sum of squares; MS - mean square; CV - coefficient of variation.

Large genetic variation exists within populations of tree species with mixed reproductive systems and efficient pollen and seed dispersion (Yun et al., 1998), which result in long-distance gene flow, reduced variation between populations, and increased variation within them (Loveless and Hamrick, 1984). The pattern we observed was not in accordance with those of other tree species, and with what is expected in allogamous species. In the mangaba population evaluated, gene flow could be restricted and consequently the intrapopulation diversity was low, whereas it was high among populations.

The genetic structures of plant populations are dependent upon the interactions of many different processes, such as habitat fragmentation and/or population isolation, range changes, mutation, ecology, reproductive isolation, genetic drift, reproductive mechanism, gene flow, and selection (Thendral Hepsibha et al., 2010). Genetic diversity greatly contributes to the sustainability of plant populations (Wang et al., 2007), and its study is necessary to understand what occurs in populations (Silva et al., 2012b).

Mangaba is an endangered species in northeastern Brazil, and Sergipe State is subject to high human activity. This compromises the survival of this species, which is part of the social and economic heritage of this state. Habitat fragmentation caused the main limitation of this study, as it was difficult to collect a large number of individuals in some populations. Studies that investigate species distributions and genetic compositions are very important for the conservation and improvement of this species. A good strategy for the effective conservation of the genetic variability of these genetic resources would be the conservation of populations in the geographical range of the species. This has been conducted by the maintenance of a mangaba gene bank and the creation of private natural heritage reserves. The mangaba gene bank of the Embrapa Coastal Tablelands is in Sergipe, and 1232.30 ha of private reserves exist, the largest being "Caju" reserve in Itaporanga d'Ajuda, with 763.37 ha (ICMBIO, 2016).

The ISSR markers used in this study were effective in estimating genetic variability between mangaba populations, and the high degree of polymorphism detected suggests that the genetic diversity of remnant populations in the State of Sergipe can provide important information for the conservation and future improvement of this species.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank CNPq for the split PhD scholarship granted to A.N.R. Soares (Process #203542/2014-2) and the Embrapa Coastal Tablelands for assisting with the study.

REFERENCES

Alzate-Marin AL, Guidugli MC, Soriani HH, Martinez CA, et al. (2009). An efficient and rapid DNA minipreparation procedure suitable for PCR/SSR and RAPD analyses in tropical forest tree species. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 5: 1217-1224. http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132009000500020

Amorim JAE, Silva AVC, Vitória MF and Ramos SR (2013). Diversidade genética de indivíduos de mangabeira oriundos do povoado Abais, em Sergipe. Anais do 7º Congresso Brasileiro de Melhoramento Vegetal, Uberlândia. Available at [http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/91073/1/diversidade-genetica-mangabeira-SE.pdf]

Amorim JAE, Mata LR, Lédo AS, Azevedo VCR, et al. (2015). Diversity and genetic structure of mangaba remnants in states of northeastern Brazil. Genet. Mol. Res. 14: 823-833. http://dx.doi.org/10.4238/2015.February.2.7

Barreira S, Sebbenn AM, Scolforo JRS and Kageyama PY (2006). Diversidade genética e sistema de reprodução em população nativa de Eremanthus erythropappus (DC.) MacLeish sob exploração. Sci. Forest. 71: 119-130.

Barros DI, Bruno RLA, Nunes HV, Silva GC, et al. (2006). Different extraction methods aiming mangaba seeds quality. Rev. Bras. Frutic. 28: 25-27. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452006000100010

Black-Samuelsson S, Eriksson G, Gustafsson L and Gustafsson P (1997). RAPD and morphological analysis of the rare plant species Vicia pisiformis (Fabaceae). Biol. J. Linn. Soc. 61: 325-343.

Brandão MM, Vieira FA and Carvalho D (2011). Fine-scale genetic structure of Myrcia splandans (Myrtaceae). Rev. Árvore 35: 957-964.

Brown AHD and Weir BS (1983). Measuring genetic variability in plant populations. In: Isozymes in plant genetics and breeding, part A (Tanksley SD and Orton TJ, eds.). Elsevier, Amsterdam, 219-239.

- Chagas KPT, Sousa RF, Farjado CG and Vieria FA (2015). Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de Elaeis guineensis. Rev. Bras. Cien. Agr. 10: 147-152.
- Costa TS, Silva AVC, Lédo AS, Santos ARF, et al. (2011). Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. Pesq. Agropec. Bras. 46: 499-508. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011000500007
- Darrault RO and Schlindwein C (2005). Limited fruit production in Hancornia speciosa (Apocynaceae) and pollination by nocturnal and diurnal insects with long mouth parts. Biotropica 37: 381-388. http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7429.2005.00050.x
- Darrault RO and Schlindwein C (2006). Polinização. In: A cultura da mangabeira (Silva Junior JF and Ledo AS, Org.). Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, 43-56.
- Dias FTC, Bertini CHCM, Silva APM and Cavalcanti JJV (2015). Variabilidade genética de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce analisada por marcadores RAPD e ISSR. Rer. Cien. Agr. 46: 563-572.
- Doyle JJ and Doyle JL (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
- Ganga RMD, Ferreira GA, Chaves LJ and Naves RV (2010). Caracterização de frutos e árvores de populações naturais de Hancornia speciosa Gomes do cerrado. Rev. Bras. Frutic. 32: 101-113. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452010005000019
- Giustina LD, Luz LN, Vieira FS, Rossi FS, et al. (2014). Population structure and genetic diversity in natural populations of Theobroma spectosum Willd. Ex Spreng. (Malvaceae). Genet. Mol. Res. 13: 3510-3519. http://dx.doi. org/10.4238/2014.February.14.5
- ICMBIO (Instituto Chico Mendes MMA) (2016). Reservas particulares do patrimônio natural, RPPN, Sergipe. ICMBIO, Brazil. http://sistemas.icmbio.gov.br/simrppn/publico/detalhe/763/.
- Jimenez HJ, Martins LSS, Montarroyos AVV, Silva Junior JF, et al. (2015). Genetic diversity of the neotropical tree Hancomta spectosa Gomes in natural populations in northeastern Brazil. Genet. Mol. Res. 14: 17749-17757. http:// dx.doi.org/10.4238/2015.December.21.48
- Liu D, He X, Liu G and Huang B (2011). Genetic diversity and phylogenetic relationship of Tadehagi in southwest China evaluated by inter-simple sequence repeat (ISSR). Genet. Res. Crop Evol. 58: 679-688. http://dx.doi.org/10.1007/ s10722-010-9611-3
- Lorenzoni RM, Soares TCB, Santiago VF, Silva JA, et al. (2014). Utilização de marcadores ISSR na avaliação da divergência genética entre acessos de biribazeiro. Rev. Bras. Frutic. 36: 251-257. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452014000500029
- Loveless MD and Hamrick JL (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. Annu. Rev. Ecol. Syst. 15: 65-95. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.es.15.110184.000433
- Luz GA, Gomes SO, Araujo Neto RB, Nascimento MSCB, et al. (2015). Molecular characterization of accessions of Cratylia argentea (Camaratuba) using ISSR markers. Genet. Mol. Res. 14: 15242-15248. http://dx.doi. org/10.4238/2015.November.25.12
- Lynch M and Milligan BG (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. Mol. Ecol. 3: 91-99. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.1994.tb00109.x
- Morales RGF, Resende JTV, Faria MV, Silva PR, et al. (2011). Divergência genética em cultivares de morangueiro, baseada em caracteres morfoagronômicos. Rev. Ceres 3: 323-329. http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2011000300012
- Page RDM (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput. Appl. Biosci. 12: 357-358.
- Peakall R and Smouse PE (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol. Ecol. Notes 6: 288-295. http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
- Pinheiro LR, Rabbani ARC, Silva AVC, Lédo AS, et al. (2012). Genetic diversity and population structure in the Brazilian Cattleya labtata (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. Plant Syst. Evol. 298: 1815-1825. http://dx.doi. org/10.1007/s00606-012-0682-9
- Rivas LH, Giustina LD, Luz LN, Karsburg IV, et al. (2013). Genetic diversity in natural populations of Theobroma subtricanum Mart. in the Brazilian Amazon. Genet. Mol. Res. 12: 4998-5006. http://dx.doi.org/10.4238/2013. October 24.12
- Santana IBB, Oliveira EJ, Soares-Filho WS, Ritzinger R, et al. (2011). Variabilidade genética entre acessos de umbucajazeira mediante análise de marcadores ISSR. Rev. Bras. Frutic. 33: 868-876. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452011005000090
- Santos PCG, Alves EU, Guedes RS, Silva KB, et al. (2010). Quality of Hancornta spectosa Gomes seeds in function of drying periods. Semina: Cienc. Agric. 31: 343-352.
- Sheng Y, Zheng WH, Pei KQ and Ma KP (2004). Population genetic structure of a dominant desert tree, Haloxylon ammodendron (Chenopodiaceae), in the southeast Gurbantunggut Desert detected by RAPD and ISSR markers. Acta

- Bot. Sin. 46: 675-681.
- Silva AVC, Santos ARF, Lédo AS, Feitosa RB, et al. (2012a). Moringa genetic diversity from Germplasm Bank using RAPD markers. Trop. Subtrop. Agroecosyst. 15: 31-39.
- Silva AVC, Rabbani ARC, Sena-Filho JG, Almeida CS, et al. (2012b). Genetic diversity analysis of mangaba (Hancornta speciosa Gomes), an exotic Brazilian tropical species. Trop. Subtrop. Agroecosyst. 15: 217-225.
- Souza LMFI, Kageyama PY and Sebbenn AM (2004). Estrutura genética em populações fragmentadas de Chorista speciosa St. Hil (Bombacaceae). Sci. Forest. 65: 70-79.
- Souza-Sobreira FB, Souza GB, Rosado CCG, Miranda FD, et al. (2015). Genetic diversity in three natural populations of Pitcairnia flammea (l.) John (Bromeliaceae) estimated by ISSR markers. Genet. Mol. Res. 14: 15892-15901. http:// dx.doi.org/10.4238/2015.December.3.1
- Thendral Hepsibha B, Premalakshmi V and Sekar T (2010). Genetic diversity in Azima tetracantha (Lam) assessed through RAPD analysis. Indian J. Sci. Technol. 3: 170-173.
- Uysal H, Yong-Bi F, Kurt O, Peterson GW, et al. (2010). Genetic diversity of cultivated flax (Liman usitatissimum L.) as revealed by ISSR markers. Genet. Res. Crop Evol. 57: 1109-1119. http://dx.doi.org/10.1007/s10722-010-9551-v
- Wang W, Chen L, Yang P, Hou L, et al. (2007). Assessing genetic diversity of populations of top mouth culter (Culteral burmus) in China using AFLP markers. Btochem. Syst. Ecol. 35: 662-669. http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2007.04.008
- Yun R, Zhong M, Wang H-X, Wei W, et al. (1998). Study on DNA diversity of Liaodong oak population at Dongling Mountain Region, Beijing. Acta Bot. Sin. 40: 169-175.
- Zanella CM, Janke A, Palma-Silva C, Kaltchuk-Santos E, et al. (2012). Genetics, evolution and conservation of Bromeliaceae. Genet. Mol. Btol. 35: 1020-1026. http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572012000600017