



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS NATURAIS**

**ESTRUTURA GENÉTICA DE REMANESCENTES DE
MANGABEIRA NO NORDESTE BRASILEIRO**

JULIE ANNE ESPÍNDOLA AMORIM

**SÃO CRISTÓVÃO - SE
2014**

JULIE ANNE ESPÍNDOLA AMORIM

**ESTRUTURA GENÉTICA DE REMANESCENTES DE MANGABEIRA NO
NORDESTE BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação
em Biotecnologia da Universidade Federal de Sergipe
como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia na área de concentração Biotecnologia
em Recursos Naturais.

Orientadora

Dra. Ana Veruska Cruz da Silva

Co-orientadora

Dra. Vânia Cristina Rennó Azevedo

SÃO CRISTÓVÃO - SE

2014

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

A524e Amorim, Julie Anne Espíndola
Estrutura genética de remanescentes da mangabeira no
nordeste brasileiro / Julie Anne Espíndola Amorim ; orientadora
Ana Veruska Cruz da Silva. – São Cristóvão, 2014.
47 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais)
– Universidade Federal de Sergipe, 2014.

1. Biotecnologia vegetal. 2. Mangabeira – Biotecnologia. 3.
Mangabeira – Genética – Variedades. 4. Microsatélites (Genética).
I. Silva, Ana Veruska Cruz da, orient. II. Título.

CDU 606:582.923.5:575

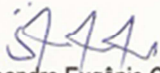
JULIE ANNE ESPÍNDOLA AMORIM

**ESTRUTURA GENÉTICA DE REMANESCENTES DE MANGABEIRA NO
NORDESTE BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação
em Biotecnologia da Universidade Federal de Sergipe
como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia na área de concentração Biotecnologia
em Recursos Naturais.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2014.


Prof.^a. Dra. Ana da Silva Léo
PROBIOTEC-UFS/Embrapa Tabuleiros Costeiros


Prof. Dr. Leandro Eugênio Cardamone Diniz
Universidade Tiradentes/Unit


Prof.^a. Dra. Ana Veruska Cruz da Silva
Orientadora
PROBIOTEC-UFS/Embrapa Tabuleiros Costeiros

SÃO CRISTÓVÃO - SE

2014

*A Deus,
Aos meus pais Julio Roberto e Suely,
Ao meu irmão Paulo Roberto, e
Ao meu namorado Edivilson,
Dedico.*

*"Deus nunca disse que a jornada seria fácil, mas Ele disse que a chegada valeria a pena."
(Max Lucado).*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por se fazer presente em todos os dias de minha vida, dando-me inspiração, força, coragem e permitindo a conclusão desse trabalho.

À Dra. Ana Veruska Cruz da Silva Muniz, pela confiança, apoio, amizade, estímulo, ensinamentos e sugestões.

À Dra. Vânia Cristina Rennó Azevedo pelas sugestões, ensinamentos e pela receptividade e oportunidade de realização deste projeto nas instalações do Laboratório de Genética vegetal da Embrapa Cenargen.

Ao meu pai, pesquisador Julio Roberto Araujo de Amorim, que me prova, a cada dia, que o amor à profissão é o que nos torna excelentes profissionais, por ser um dos maiores incentivadores e exemplo para mim, pela revisão do texto e ensinamentos e por todo seu carinho, amor e apoio incondicional.

À minha mãe Suely, por ser a melhor mãe do mundo e por amparar-me sempre nos momentos mais difíceis da minha vida, dando-me força e coragem para lutar pelos meus sonhos, mostrando-me que sou capaz de realizá-los.

Ao meu irmão Paulo Roberto, por estar presente em todos os momentos, apoiando-me, protegendo-me e dando-me a certeza de que nunca estarei sozinha na caminhada da vida.

Aos demais familiares, que mesmo longe torcem por mim e pelo meu sucesso.

Ao meu namorado Edilson, por tornar essa caminhada mais prazerosa e amena com seu amor, paciência e companhia.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Tabuleiros Costeiros e, em especial, à Marina e ao Sílvia por todo apoio, paciência e amizade.

A todos os funcionários e estagiários do Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Cenargen, pela receptividade, paciência e apoio.

À Embrapa Tabuleiros Costeiros, pela oportunidade de realização deste projeto nas instalações do Laboratório de Biologia Molecular.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

À Universidade Federal de Sergipe (UFS), pela oportunidade de realização do mestrado.

Aos meus amigos, pela torcida, boas conversas, risadas e momentos de distração.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Recursos genéticos de frutíferas nativas	3
2.2 Aspectos gerais da mangabeira	4
2.3 Diversidade genética e marcadores moleculares	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Amostragem das populações e coleta de material vegetal	10
3.2 Procedimentos laboratoriais	11
3.2.1 Extração de DNA	11
3.2.2 Eletroforese, quantificação e diluição das amostras	13
3.2.3 Teste para seleção de iniciadores microssatélites e PCR	14
3.2.4 Eletroforese capilar em sequenciador automático	14
3.3 Análise de dados	15
3.3.1 Detecção dos picos de fluorescência e genotipagem dos indivíduos	15
3.3.2 Detecção de alelos nulos	16
3.3.3 Caracterização da variabilidade genética intra e interpopulacional	16
3.3.4 Estrutura genética populacional	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 Iniciadores microssatélites selecionados	19
4.2 Alelos nulos, equilíbrio de Hardy-Weinberg e equilíbrio de ligação	19

4.3. Variabilidade Genética	20
4.4 Estrutura genética populacional	32
5. CONCLUSÕES	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
7. ANEXOS	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados)
AMOVA	<i>Analysis of Molecular Variance</i> (Análise de Variância Molecular)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Albumina de soro bovino)
CTAB	<i>Cetyltrimethylammonium bromide</i> (Brometo de cetiltrimetilamônio)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i> (Desoxirribonucleotídeo trifosfatado)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
6-FAM	<i>6-Carboxyfluorescein</i> (6-Carboxifluoresceína)
GDA	<i>Genetic Data Analysis</i> (Análise de Dados Genéticos)
GPS	<i>Global Positioning System</i> (Sistema de Posicionamento Global)
HEX	<i>Hexachloro-6-carboxyfluorescein</i> (Hexacloro-6-carboxifluoresceína)
ISSR	<i>Inter Simple Sequence Repeats</i> (Intersequências Simples Repetidas)
MCMC	<i>Markov Chain Monte Carlo</i> (Monte Carlo via Cadeias de Markov)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PVP	<i>Polyvinylpyrrolidone</i> (Polivinilpirrolidona)
RAPD	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i> (DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso)
RFPL	<i>Polymorphism Restriction Fragment Length</i> (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição)
RPM	Rotações por minuto
ROX	Carboxy-X-rhodamine (Carboxi-X-rodamina)
SSR	<i>Simple Sequence Repeats</i> (Sequências Simples Repetidas)
TBE	Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3
TE	Tris-HCL 10 mM, pH 8,0 e EDTA 1 mM

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspecto morfológico da mangabeira (<i>Hancornia speciosa</i>): árvore (A), fruto (B), flor e folhas (C), tronco (D) e sementes (E)	5
Figura 2 - Localização das populações naturais de <i>H. speciosa</i> nos Estados de Sergipe, Ceará e Pernambuco, onde foram coletadas as amostras para estudos de diversidade e estrutura genética	10
Figura 3 - Coleta (A) e material foliar de <i>H. speciosa</i> embalado e identificado (B)	12
Figura 4 - Quantificação do DNA extraído em gel de agarose a 2,0 %, por comparação com padrão de massa molecular conhecida (DNA do bacteriófago λ nas concentrações de 10, 50 e 100 ng/ μ L)	13
Figura 5 - Genotipagem de indivíduos homozigoto (A) e heterozigoto (B) de <i>H. speciosa</i> para o loco analisado por meio do <i>software</i> GeneMapper	16
Figura 6 - Distribuição das frequências alélicas dos nove locos analisados para a população Reserva do Caju	24
Figura 7 - Distribuição das frequências alélicas dos nove locos analisados para a população Abaís	25
Figura 8 - Distribuição das frequências alélicas dos nove locos analisados para a população Barra dos coqueiros	26
Figura 9 - Distribuição das frequências alélicas dos nove locos analisados para a população Jacarecoara	29
Figura 10 - Distribuição das frequências alélicas dos nove locos analisados para a população Tapera	28
Figura 11 - Distribuição das frequências alélicas dos nove locos analisados para a população Tamandaré	29
Figura 12 - Porcentagens de alelos raros para cada uma das seis populações de <i>H. speciosa</i>	30
Figura 13 - Correlação entre os valores de K (número de grupos genéticos identificados) e ΔK para as populações de <i>H. speciosa</i>	33

Figura 14 - Estrutura genética das populações de *H. speciosa* em função da análise Bayesiana de agrupamentos implementada pelo programa STRUCTURE para $K = 2$, com amostras ordenadas por população: 1 = Reserva do Caju (Sergipe), 2 = Abaís (Sergipe), 3 = Barrados dos Coqueiros (Sergipe), 4 = Jacarecoara (Ceará), 5 = Tapera (Ceará) e 6 = Tamandaré (Pernambuco). Cada grupo é representado por uma cor e cada indivíduo, por uma barra vertical 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação, localização geográfica e tamanho amostral das seis populações de <i>H. speciosa</i>	11
Tabela 2 - Temperatura de anelamento (T_a), motivos de repetição, amplitude alélica (pb) e fluorescência de iniciadores microssatélites testados para caracterização genética das populações de <i>H. speciosa</i>	15
Tabela 3 - Frequência de alelos nulos dos 11 locos com potencial para utilização em estudos de genética populacional das seis populações naturais de <i>H. speciosa</i>	20
Tabela 4 - Médias de tamanho amostral (n), número de alelos (A), riqueza alélica (R), alelos privados (A_p), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o) e coeficiente de endogamia (f) em relação aos nove locos avaliados para as seis populações de <i>H. speciosa</i>	21
Tabela 5 - Índices de diversidade genética entre populações (G_{ST} , F_{ST} , R_{ST}), índice de fixação total (F_{IT}) e índice de fixação dentro das populações (F_{IS}) obtidos para diferentes grupos de populações de <i>H. speciosa</i>	30
Tabela 6 - Matriz de divergência correlacionando F_{ST} (índice de divergência genética, diagonal abaixo) e $M = 2Nm$ (número absoluto de migrantes, diagonal acima) entre as populações de <i>H. speciosa</i>	31
Tabela 7 - Distribuição da variabilidade genética de <i>H. speciosa</i> com base na análise de variância molecular (AMOVA) de nove locos	32

AMORIM, Julie Anne Espíndola. **Estrutura genética de remanescentes de mangabeira no Nordeste brasileiro**. 2014. 47 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Recursos Naturais) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2014.

RESUMO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma árvore frutífera nativa e de ampla distribuição geográfica na Região Nordeste e no Cerrado do Brasil. Atualmente, a crescente degradação e a consequente redução das áreas de ocorrência naturais resultantes de atividades antrópicas vêm exercendo forte pressão sobre as populações nativas da espécie. O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade e a estrutura genética de populações de mangabeira remanescentes no Nordeste brasileiro, por meio de marcadores microssatélites (SSR). Foram amostrados aleatoriamente de 6 a 20 indivíduos por população, num total de 94 indivíduos e seis populações oriundas dos Estados de Sergipe (Reserva do Caju, Barra dos Coqueiros e Abaís), Ceará (Jacarecoara e Tapera) e Pernambuco (Tamandaré). As regiões com microssatélites foram amplificadas utilizando-se nove *primers*, previamente desenvolvidos. Todas as populações apresentaram coeficientes de endogamia (f) positivos, indicando que são endogâmicas, com excesso de homozigotos, ausência de cruzamento aleatório e existência de fatores influenciando a aleatoriedade alélica. Observou-se o maior valor de variabilidade genética na população Jacarecoara (Ceará) e, o menor na população Barra dos Coqueiros (Sergipe). Os valores dos índices de diversidade genética G_{ST} , F_{ST} e R_{ST} estimados para as seis populações foram iguais a 0,14 ($p < 0,05$), revelando moderada diferenciação genética entre elas. Verificou-se o menor valor de pares de F_{ST} ($p > 0,05$) entre as populações Jacarecoara e Tapera (0,005), enquanto o maior foi observado entre as populações Barra dos Coqueiros e Jacarecoara (0,287). A população Jacarecoara foi a mais divergente em relação às demais. A análise Bayesiana de agrupamentos evidenciou diferenciação genética das populações de *H. speciosa* em dois grupos ($K = 2$). Portanto, com base nesses resultados, depreende-se que as populações de *H. speciosa* apresentam moderada diversidade genética interpopulacional, sendo a maior variação devida a divergências dentro de populações (83,18%), e que essas populações têm potencial genético para a conservação *in situ* da espécie, bem como para coleta de germoplasma visando à conservação *ex situ*.

Palavras-chave: *Hancornia speciosa*, variabilidade genética, marcadores microssatélites.

Comitê de Orientação: Ana Veruska Cruz da Silva – Embrapa Tabuleiros Costeiros/ Universidade Federal de Sergipe (Orientadora); Vânia Cristina Rennó Azevedo – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Co-orientadora).

AMORIM, Julie Anne Espíndola. **Genetic structure of remaining populations of mangaba tree in Northeastern Brazil**. 2014. 47 f. Dissertation (Master in Biotechnology on Natural Resources) – Sergipe Federal University, São Cristóvão, 2014.

ABSTRACT

Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) is a native fruit tree and geographically widespread in the Northeast Region and the Cerrado of Brazil. Currently, the increasing degradation and consequent reduction of natural occurrence areas resulting from anthropogenic activities has been putting strong pressure on native populations of this species. The aim of this study was to evaluate the diversity and genetic structure of remaining populations of mangaba tree in Northeastern Brazil by means of microsatellite (SSR) markers. From 6 to 20 individuals per population were randomly sampled, totaling 94 individuals and six populations proceeding from the States of Sergipe (Reserva do Caju, Barra dos Coqueiros, and Abaís), Ceará (Jacarecoara and Tapera), and Pernambuco (Tamandaré). Microsatellite regions were amplified by using nine primers previously developed. All populations had positive inbreeding coefficients (f), indicating that they are endogamous populations, with excess of homozygotes, absence of random outcrossing and existence of factors influencing allelic randomness. The highest value of genetic variability was observed in the population Jacarecoara from the State of Ceará and the lowest value, in the population Barra dos Coqueiros from the State of Sergipe. The values of genetic diversity indices G_{ST} , R_{ST} , and F_{ST} estimated for the six populations were equal to 0.14 ($p < 0.05$), showing moderate genetic differentiation among them. The lowest value of F_{ST} pairs ($p > 0.05$) was found between the populations Jacarecoara and Tapera (0.005), while the highest value was observed between populations Barra dos Coqueiros and Jacarecoara (0.287). The population Jacarecoara was the most divergent in relation to the others. Bayesian clustering analysis showed genetic differentiation of *H. speciosa* populations in two groups ($K = 2$). Therefore, the results show that populations of *H. speciosa* have moderate interpopulational genetic diversity, with the greatest variation due to differences within populations (83.18%), and that these populations have genetic potential for *in situ* conservation of the species, as well as for germplasm collection for *ex situ* conservation.

Keywords: *Hancornia speciosa*, genetic diversity, microsatellite markers.

Guidance Committee: Ana Veruska Cruz da Silva – Embrapa Coastal Tablelands/Federal University of Sergipe (Adviser); Vânia Cristina Rennó Azevedo – Embrapa Genetic Resources and Biotechnology (Co-adviser).

1. INTRODUÇÃO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma árvore frutífera, nativa do Brasil e de ampla distribuição geográfica. Ocorre naturalmente nas áreas de Tabuleiros Costeiros e Baixadas Litorâneas da Região Nordeste e nos Cerrados das Regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste (VIEIRA NETO, 1994; MOURA et al., 2005; SOARES et al., 2006).

A polpa da mangaba, por apresentar altos conteúdos de sólidos solúveis totais associados à elevada acidez que lhe conferem um sabor muito apreciado (SOARES et al., 2006), é bastante consumida *in natura* e usada como matéria-prima para o preparo de vários produtos, como: geleia, doce, xarope, compota, vinho, vinagre e, principalmente, suco e sorvete (MATTIETTO et al., 2003; MOURA et al., 2008; SILVA et al., 2011). Destaca-se, assim, pelo potencial econômico, o que tem despertado crescente interesse dos setores ligados à indústria e ao comércio (GANGA et al., 2010).

O Estado de Sergipe é o maior produtor nacional de mangaba, com destaque para os municípios de Itaporanga D'Ajuda, Amparo do São Francisco, Pirambu, Estância, Indiaroba e Barra dos Coqueiros (IBGE, 2013). A coleta dos frutos, oriundos de populações naturais em sua grande maioria, é uma atividade predominante extrativista, exercida principalmente pelas chamadas *catadoras de mangaba*, com consequente importância socioeconômica e cultural para o estado (SANTOS et al., 2007).

No entanto, diversos fatores, como fragmentação florestal, expansão imobiliária, turismo e aumento das áreas cultivadas com coqueiro, pastagens e cana-de-açúcar (LEDERMAN et al., 2000; MOURA et al., 2005; SILVA JUNIOR et al., 2007), vêm contribuindo para rápida redução das áreas de ocorrência natural e exercendo forte pressão sobre as populações de mangabeiras nativas. Por isso, estudos sobre diversidade e estrutura genética de populações remanescentes de mangabeira são fundamentais para se estabelecer estratégias de conservação do germoplasma e de preservação da espécie, diante da crescente redução das áreas de ocorrência natural.

Ademais, as características agronômicas a serem consideradas em programas de melhoramento genéticos, para que o cultivo comercial da espécie seja economicamente viável, ainda não estão bem estabelecidas, principalmente em relação à produtividade, estabilidade na produção e qualidade de frutos (GANGA et al., 2010).

A diversidade genética é um fator importante para a sobrevivência das populações em condições ambientais variáveis, sendo reconhecida como um componente fundamental da biodiversidade (MACE et al., 1996). Por conseguinte, o conhecimento de como a variação genética é dividida entre as populações pode ter implicações importantes não só

na biologia evolutiva e ecologia, mas também na biologia da conservação (BARLLOUX; LUGON-MOULIN, 2002).

A estrutura genética das populações de plantas, por sua vez, reflete as interações de muitos processos diferentes, tais como: a história evolutiva de longo prazo das espécies (como mudanças na distribuição, fragmentação do habitat e isolamento da população), mutação, isolamento reprodutivo, geográfico e ecológico, deriva genética, sistema de cruzamento, fluxo gênico e seleção (TRIPATHI et al., 2007; THENDRAL HEPSIBHA et al., 2010; SILVA et al., 2012).

A diversidade genética contribui muito para a sustentabilidade das populações de espécies vegetais (WANG et al., 2007) e sua estimativa é importante para compreender os eventos que ocorrem na população (SILVA et al., 2012). Uma das formas de se avaliar essa diversidade genética consiste na caracterização molecular que permite inferir sobre o grau de polimorfismo entre indivíduos e populações (COSTA et al., 2011), por meio de técnicas de marcadores moleculares ou de DNA que não são influenciadas por condições ambientais e não apresentam efeito pleiotrópico (TANKSLEY et al., 1989).

A realização de pesquisa por meio de marcadores moleculares para descrever a variabilidade presente em populações naturais de mangabeira é recente e em número reduzido (MOURA et al., 2005; GANGA et al., 2010; COSTA et al., 2011, MOURA et al., 2011; SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2012).

Entre os marcadores moleculares utilizados no processo de caracterização de germoplasma, os marcadores microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSR) constituem uma das técnicas mais indicadas para estudos de polimorfismo entre sequências de DNA, por serem codominantes, abundantes, aparentemente distribuídos por todo o genoma, multialélicos, dependentes de pequena quantidade de DNA e baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (BUSO et al., 2003).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi analisar a diversidade e a estrutura genética de populações remanescentes de mangabeira nos Estados do Ceará, Pernambuco e Sergipe, por meio da técnica de marcadores microssatélites.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Recursos genéticos de espécies frutíferas nativas

O Brasil reúne uma imensa diversidade florística, que se encontra distribuída pelos mais diferentes ecossistemas. Dentre as categorias existentes, as espécies frutíferas destacam-se pelo elevado valor econômico, tanto no comércio de frutas frescas como na produção de matérias-primas para a agroindústria. Além disso, muitas dessas frutas são importantes fontes de alimento e de sustento para as populações de baixa renda em várias partes do país (SILVA JUNIOR et al., 1999).

Apesar de toda a importância que reveste as espécies frutíferas tropicais e de seu potencial econômico, muitos materiais que se encontram em estado selvagem ou não domesticado apresentam forte tendência ao desaparecimento (SILVA JUNIOR et al., 1999), devido à degradação das áreas naturais de ocorrência, principalmente pela atividade agropecuária com cultivos intensivos, o que tem acarretado grande erosão genética em algumas espécies, registrando-se perdas irreversíveis de germoplasma, sem que se tenha conhecimento da sua existência (SILVA JUNIOR et al., 2012).

O Nordeste brasileiro apresenta condições climáticas favoráveis ao cultivo de diversas espécies frutíferas de clima tropical, o que é evidenciado pela expressiva diversidade de espécies nativas encontradas na Região (CARVALHO et al., 2002). Entre os recursos genéticos frutícolas conhecidos, têm-se a mangaba, umbu, seriguela, cajá, sapoti e jenipapo. Conforme inventário realizado por Ramos et al. (2008), os bancos e coleções de germoplasma de frutíferas do Nordeste conservavam 7.233 acessos, distribuídos em 38 gêneros, dos quais mais de 2.000 acessos estão concentrados nos gêneros *Anacardium*, *Passiflora*, *Spondias* e *Hancornia*, todos nativos e com grande potencial econômico.

A exploração de espécies frutíferas nativas na Região ocorre na maioria das vezes de uma forma extrativista não sustentável, em razão da falta de conhecimento de quem as utiliza; pois muitos não têm noção do que são recursos genéticos e da importância da conservação de germoplasma (CARVALHO et al., 2002). A caracterização genética, por sua vez, permite um melhor conhecimento dos recursos genéticos disponíveis e da estrutura genética das populações, auxiliando o processo de seleção de populações e/ou de plantas individuais com características desejáveis para o cultivo (GIACOMETTI, 1993).

O grande potencial de várias espécies frutíferas tropicais nativas e exóticas, ainda pouco exploradas, assim como a necessidade urgente de seleção de cultivares mais adaptáveis às condições locais e que atendam melhor às exigências dos consumidores,

evidencia a importância da manutenção de um banco de germoplasma dessas espécies para aproveitamento em programas atuais e futuros (LUNA; RAMOS JÚNIOR, 2005).

Existem sete bancos ativos de germoplasmas de mangabeira no Brasil (GANGA et al., 2008; PEREIRA et al., 2006; RAMOS et al., 2008;). Um deles é o Banco Ativo de Germoplasma de Mangabeira (BGMangaba) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, situado no Campo Experimental de Itaporanga, município de Itaporanga D'Ajuda, em Sergipe, o qual é constituído por 11 acessos, totalizando 55 indivíduos, propagados por sementes.

2.2 Aspectos gerais da mangabeira

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma árvore que apresenta porte médio, variando de 2 a 10 m de altura, cujo fruto é conhecido popularmente como mangaba. A copa é ampla, às vezes mais larga que alta, os galhos são abundantes e com folhagens reduzidas. Apresenta troncos tortuosos, ramificados e ásperos, as folhas são opostas, simples, pecioladas, glabras, brilhantes e coriáceas, de forma e tamanho variado (SILVA JUNIOR; LÉDO, 2006). Sua inflorescência possui de uma a sete flores hermafroditas, de coloração branca e perfumada. O fruto é do tipo baga, de formato elipsoide ou arredondado, com exocarpo amarelo; cada fruto contém de duas a dez sementes discoides, delgadas e rugosas de coloração castanho-claro, medindo de 7 a 8 mm de diâmetro (SOARES et al., 2006; PEREIRA et al., 2006; COSTA et al., 2011), conforme apresentado na Figura 1.

A espécie *Hancornia speciosa* pertence à família Apocynaceae e compreende seis variedades botânicas: *H. speciosa* var. *speciosa*, *H. speciosa* var. *maximiliani*, *H. speciosa* var. *cuyabensis*, *H. speciosa* var. *lundii*, *H. speciosa* var. *gardneri* e *H. speciosa* var. *pubescens* (MONACHINO, 1945; GANGA et al., 2010), que se diferenciam por algumas características morfológicas da folha e da flor (MOURA et al., 2008). A variedade *speciosa* predomina nos estados do Nordeste; a *gardneri* ocorre no Brasil Central; a *pubescens*, em Goiás e Minas Gerais; a *cuyabensis*, no Mato Grosso, mais especificamente na Chapada dos Guimarães; a *maximiliani*, em Minas Gerais; e a *lundii*, em Minas Gerais, Pernambuco, Bahia e Goiás (MONACHINO, 1945).

Planta perenifólia de clima tropical, que ocorre, sobretudo, em áreas de vegetação aberta, a mangabeira apresenta maior desenvolvimento vegetativo nas épocas com temperatura mais elevada (24 a 26 °C), pluviosidade entre 750 e 1.600 mm anuais e solos pobres e arenosos, predominantes nas regiões de Cerrado e de Tabuleiros Costeiros (SOARES et al., 2006). Na Baixada Litorânea e nos Tabuleiros Costeiros do Nordeste, apresenta duas floradas por ano, sendo uma no início da estação chuvosa (abril a maio),

com colheita entre julho e setembro, e a outra no período seco (outubro a dezembro), com colheita entre janeiro e março (AGUIAR FILHO et al., 1998; MATTIETTO et al., 2003).



Figura 1 - Aspectos morfológicos da mangabeira (*Hancornia speciosa*): árvore (A), frutos (B), flores e folhas (C), tronco (D) e sementes (E).

A mangabeira é uma planta alógama (de polinização cruzada), autoincompatível, necessitando da participação de indivíduos diferentes e de polinizadores específicos para que ocorra a fecundação e a produção de frutos (DARRAULT; SCHLINDWEIN, 2003, 2006; PEREIRA et al., 2006; PINTO et al., 2008; MOURA et al., 2011). Esses polinizadores são de diversos grupos taxonômicos, como *Sphingidae*, abelhas (*Euglossini*), *Hesperiidae* e *Nymphalidae* (*Heliconius*), e o aumento de suas frequências leva a uma taxa de frutificação mais alta, frutos maiores e com mais sementes (DARRAULT; SCHLINDWEIN, 2003; PEREIRA et al., 2006).

No que se refere à exploração da mangaba em áreas naturais, a atividade extrativista realizada pelas catadoras de fruto constitui-se num bom exemplo da exploração que vem sendo praticada há séculos por populações autóctones, atividade esta que tem sido intensificada diante da importância econômica que a fruta apresenta ultimamente no contexto de valorização de produtos nativos e exóticos frescos (YOUNG, 2003).

Segundo os dados de Produção da Extração Vegetal e Silvicultura (IBGE, 2013), a produção brasileira de mangaba em 2012 alcançou 677 t, das quais quase a totalidade foi produzida na Região Nordeste (675 t). O Estado de Sergipe é o maior produtor nacional com 367 t (54,2%), seguido pela Bahia (15,5%) e Paraíba (13,1%). No entanto, a atual produção não é suficiente para atender à demanda do mercado consumidor, estando o aumento da oferta condicionado à implantação de pomares comerciais, visto que a mangaba é um fruto com demanda muito acima da capacidade de fornecimento pela atividade extrativista (MOURA, 2003).

De acordo com Pereira et al. (2006), apesar de a exploração da mangaba ainda ser predominantemente extrativista, vêm sendo implantados os primeiros pomares cultivados com fins comerciais no litoral nordestino e no Brasil Central, em virtude da boa aceitação da fruta no mercado.

O principal produto da fruta é a polpa, a qual é consumida diretamente *in natura* ou usada como matéria-prima para o preparo de vários produtos alimentícios (LEDERMAN et al., 2000; MATTIETTO et al., 2003; GANGA et al., 2010; COSTA et al., 2011), como a produção de geleia, por apresentar uma excelente acidez, e a fabricação de sorvete, pelo seu alto conteúdo de gomas, o que lhe confere propriedades funcionais de agregação, retenção de sabor e inibição na formação de cristais (NARAIN, 1990).

Estudos atuais abordando diferentes possibilidades de uso da mangaba foram realizados. Santos e Silva (2012), analisando o efeito da substituição de gordura e açúcar nas propriedades físicas e químicas do sorvete de mangaba e sua aceitabilidade, verificaram que todas as formulações tiveram bom nível de aceitação global e aparência. Assumpção et al. (2013), ao avaliarem a aceitação de um néctar misto a base de mangaba e cagaita, constataram que o produto apresentou-se atraente em função de suas características sensoriais, bem como com grande potencial nutricional e para indústria alimentícia, indicando que pode ser incluído no mercado com boas perspectivas.

2.3 Diversidade genética e marcadores moleculares

A diversidade entre os organismos é resultado das variações nas sequências de DNA provenientes de mutações, substituição de nucleotídeos simples, inserção ou deleção de

fragmentos de DNA de diferentes comprimentos (de um único a vários milhares de nucleotídeos), duplicação ou inversão de fragmentos de DNA (FAO, 2006).

Informações sobre a diversidade genética e as relações entre e dentro de populações, variedades de plantas, raças de animais e espécies são importantes para o melhoramento genético vegetal e animal, a biologia da conservação e o estudo da ecologia evolutiva das populações. Estudos de diversidade genética permitem identificar alelos que poderiam afetar a capacidade do organismo de sobreviver no seu habitat natural ou capacitá-lo para sobreviver nos mais diversos habitats. Esse conhecimento é, portanto, valioso para a conservação de germoplasma individual ou populacional e para identificação de variedades ou raças (DURAN et al., 2009).

Na determinação de diversidade genética, técnicas de marcadores moleculares têm sido utilizadas extensivamente. Para análise da diversidade de plantas, os marcadores mais empregados são: Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFPL) (SOLLER; BECKMANN, 1983), DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (*Randomly Amplified Polymorphic DNA* - RAPD) (WILLIAMS et al., 1990), Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - AFLP) (VOS et al. 1995), Intersequências Simples Repetidas (*Inter Simple Sequence Repeats* - ISSR) (ZIETKIEWICZ et al., 1994) e Microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSR) (BECKER; HEUN, 1994).

Os marcadores moleculares são definidos como sequências identificáveis de DNA encontradas em localizações específicas do genoma e transmitidas pelas leis comuns de herança de uma geração para a outra (SEMAGN et al., 2006; RODRIGUES, 2013), que surgiram como uma ferramenta importante na análise do genoma de plantas, contribuindo significativamente para o conhecimento básico das culturas, pois possibilitam a obtenção de informações relativas à variabilidade genética existente e apresentam como vantagem a identificação do polimorfismo em qualquer estágio de desenvolvimento, dando acesso ao genótipo e à variabilidade do DNA nas plantas (BICALHO, 2006), além de não sofrerem influências das condições ambientais (PINTO, 2009).

O desenvolvimento de marcadores de DNA e sua utilização na determinação da variabilidade genética dentro e entre espécies de um mesmo gênero, bem como em estudos genômicos mais elaborados que incluem a detecção de genes específicos, foram responsáveis por impulsionar as pesquisas na área da genética. Com o surgimento da técnica de PCR, em meados da década de 80, houve uma verdadeira revolução em termos de pesquisas genéticas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; NEWTON et al., 1999), devido à possibilidade da síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA.

A automatização da PCR só foi possível graças a Saiki et al. (1988), que realizaram o isolamento da enzima DNA polimerase (*Taq polimerase*) originária da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*, a qual vive em fontes termais. Várias técnicas se baseiam no princípio da PCR. Em plantas, as técnicas mais utilizadas têm sido: RFLP, RAPD e SSR (BUSO et al., 2003).

Estudos sobre diversidade de populações de mangabeira (*Hancornia speciosa*) por meio de marcadores moleculares são recentes. Os primeiros *primers* (iniciadores) de RAPD utilizados para a caracterização da estrutura genética de populações de *H. speciosa* do Cerrado foram selecionados por Moura et al. (2005). Capinan (2007) avaliou três populações nativas, originárias de três regiões do Estado da Bahia, com relação a 32 iniciadores RAPD e constatou variabilidade genética de 16,1% entre populações. Moura et al. (2008), utilizando marcadores moleculares RAPD, observaram variação significativa entre *H. speciosa* var. *pubescens* e *H. speciosa* var. *gardneri*, validando o uso de marcadores RAPD para estudo da estrutura genética de populações de mangabeira.

Moura et al. (2011), ao caracterizarem a estrutura genética de oito populações de mangabeira de quatro regiões do Cerrado, verificaram que as populações naturais de *H. speciosa* apresentam variabilidade genética interpopulacional altamente significativa. Silva et al. (2012) obtiveram resultados semelhantes, utilizando também marcadores RAPD, na caracterização genética de 20 genótipos de uma população natural do Estado de Sergipe.

Nos últimos anos, entretanto, os marcadores microssatélites vêm se destacando pelo conteúdo informativo e sua utilização em estudos ecológicos e genéticos. Microssatélites são regiões do DNA compostas de pequenos motivos de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em tandem (TÓTH et al., 2000). A técnica de microssatélites revela polimorfismo em determinado loco devido a diferenças no número de vezes em que estas repetições de sequência simples ocorrem (FERREIRA et al., 2007). A amplificação desses marcadores via PCR é realizada por meio de *primers* específicos que flanqueiam os microssatélites, sendo necessário primeiramente desenvolver tais iniciadores para a espécie a ser estudada (FALEIRO, 2007; RODRIGUES, 2013).

Os marcadores SSR apresentam muitos aspectos positivos: herança codominante, transferibilidade entre espécies correlatas, alto grau de polimorfismo mesmo entre linhagens próximas, cobertura genômica extensa e bem distribuída. A análise de polimorfismos de SSR é mais simples e econômica quando comparada a outras metodologias, além de demandar pequena quantidade de DNA, poder ser facilmente automatizada e permitir uso de técnicas de fluorescência e análise de mais de um loco por corrida pela montagem de sistemas ou conjuntos *multiplex* de locos (SEMAGN et al., 2006; GRATTAPAGLIA, 2007; KALIA et al., 2011).

As principais desvantagens do uso desse tipo de marcador são tempo prolongado e custo relativamente elevado para o desenvolvimento dos iniciadores, por tratar-se de um marcador específico. Porém, o sequenciamento de nova geração vem tornando o desenvolvimento mais eficiente. Além disso, os *primers* para microssatélites, uma vez desenvolvidos, podem ser rapidamente sintetizados e utilizados por outros grupos; e, por serem conservados em diferentes espécies, podem ser transferidos para espécies próximas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; BORÉM; CAIXETA, 2006).

Ademais, ao se utilizar marcadores microssatélites é comum a ocorrência de alelos nulos, que surgem por uma mutação na região de anelamento dos *primers* ou por um erro de genotipagem. A consequência é a detecção errônea de quantidade maior de genótipos homozigóticos nas populações avaliadas (ALDRICH et al., 1998; WHITE et al., 1999). Esses alelos têm sido encontrados em mais de 25% dos locos de microssatélites, chegando a atingir frequências superiores a 15% (JARNE; LAGODA, 1996).

Alguns estudos já foram desenvolvidos utilizando-se marcadores microssatélites em populações de diferentes espécies nativas do Brasil. Moraes et al. (2007) avaliaram o sistema de reprodução em populações fragmentadas e em árvores isoladas de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne). Tarazi et al. (2010) estudaram a estrutura genética e o sistema reprodutivo de populações de baru (*Dipteryx alata* Vogel). Melo et al. (2011) analisaram a variabilidade genética de indivíduos dessa espécie em populações naturais e em bancos de germoplasma. Santos et al. (2011) realizaram a caracterização genética de populações naturais de goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*) com marcadores microssatélites heterólogos.

No entanto, em populações de mangabeira, estudos com marcadores microssatélites foram realizados em quantidade limitada. Esses marcadores para *H. speciosa* foram desenvolvidos por Rodrigues (2009). Souza et al. (2010) realizaram um estudo preliminar de caracterização genética de populações naturais de *H. speciosa* a partir de marcadores microssatélites. Costa et al. (2012) utilizaram os mesmos marcadores para avaliar a diversidade genética e o padrão espacial da variabilidade genética dentro de uma população natural de *H. speciosa*.

Os resultados relatados pelos estudos realizados indicam que há necessidade de se conhecer melhor a estrutura e a diversidade genética de populações naturais de mangabeira, sobretudo nos estados da Região Nordeste, visto que ainda não se dispõe de informações mais aprofundadas sobre a espécie utilizando-se marcadores codominantes, nem estudos de genética que abranjam de forma mais ampla sua distribuição espacial.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem das populações e coleta de material vegetal

Foram aleatoriamente amostrados de 6 a 20 indivíduos por população nativa de *Hancornia speciosa*, num total de seis populações e 94 indivíduos, sendo 59 naturais do Estado de Sergipe (municípios de Barra dos Coqueiros, Itaporanga D'Ajuda, localidade Reserva do Caju, e Estância, localidade Abaís), 20 do Ceará (municípios de Cascavel, localidade Jacarecoara e Aquiraz, localidade Tapera) e 15 de Pernambuco (município de Tamandaré). Na Figura 2, estão ilustrados os municípios e respectivas localidades por estado em que se amostraram as populações, as quais foram georreferenciadas com o auxílio de um receptor GPS, conforme descrito na Tabela 1.

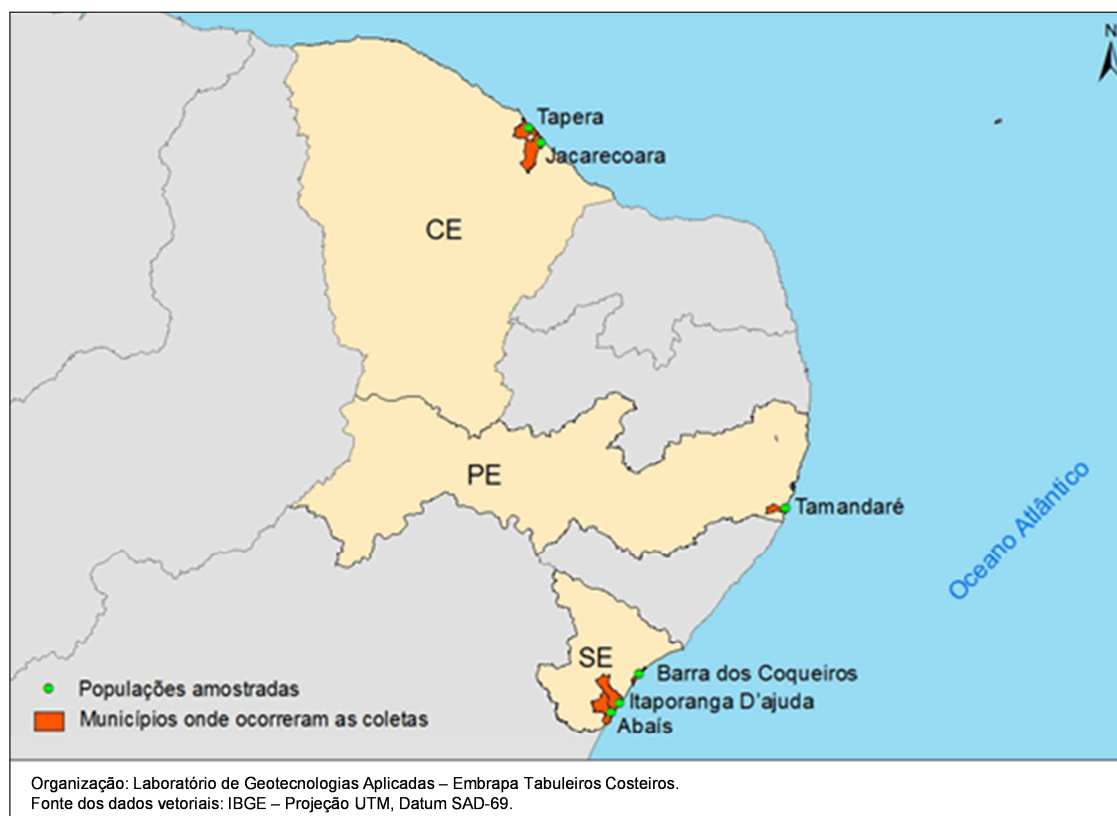


Figura 2 - Localização das populações naturais de *H. speciosa* nos Estados de Sergipe, Ceará e Pernambuco, onde foram coletadas as amostras para estudos de diversidade e estrutura genética.

Tabela 1 - Identificação, localização geográfica e tamanho amostral das seis populações de *H. speciosa*.

Populações	Coordenadas geográficas	Nº de indivíduos amostrados
Reserva do Caju (SE)	11° 11' 6" S e 37° 11' 18" O	19
Abaís (SE)	11° 18' 18" S e 37° 17' 18" O	20
Barrados Coqueiros (SE)	10° 49' 10" S e 36° 56' 52" O	20
Jacarecoara (CE)	4° 07' 10" S e 38° 10' 34" O	14
Tapera (CE)	3°56' 20" S e 38° 20' 18" O	6
Tamandaré (PE)	8° 43' 50" S e 35° 6' 10" O	15
Total		94

Por se tratarem de populações remanescentes, o número total de indivíduos das populações em alguns casos foi exatamente o tamanho real das populações, fato que impossibilitou a coleta de tamanhos amostrais maiores ou iguais a 30 indivíduos, consideradas ideais para estimar as frequências alélicas dentro das populações quando os marcadores são codominantes (BERG; HAMRICK, 1997), como os microsatélites.

Para as análises de diversidade e estrutura genética populacional, foram coletadas preferencialmente folhas jovens, sem danos mecânicos ou sinais de doença, as quais foram identificadas e acondicionadas em envelopes de sacos plásticos em estado fresco (Figura 3), visto que o material fresco é aquele que oferece melhores resultados na extração de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). O material foi em seguida transportado para o Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Tabuleiros Costeiros em caixas isotérmicas contendo gelo, a fim de evitar a degradação do material coletado. Para conservação, as amostras foliares foram mantidas refrigeradas em freezer, a -80 °C, até o momento da extração do DNA total.

3.2 Procedimentos laboratoriais

3.2.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA, foi utilizado o método baseado no protocolo CTAB padrão (DOYLE; DOYLE, 1990), modificado por Costa et al. (2011). Para tanto, cerca de cinco folhas de cada amostra coletada foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido e, imediatamente, adicionados 10 mL de tampão de extração CTAB 2%, aquecida em banho-

maria a 65 °C, juntamente com 20 µL de β-Mercaptoetanol para prevenir a oxidação. A solução tampão de extração constitui-se de 2% de CTAB (*Cetyltrimethylammonium bromide*), Tris-HCL 1 M (pH 8,0), EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) 0,2 M (pH 8,0), NaCl 1,4 M e 2% de PVP-40 (*Polyvinylpyrrolidone*).



Figura 3 - Coleta (A) e material foliar de *H. speciosa* embalado e identificado (B).

Em seguida, para solubilização das membranas celulares, o macerado de cada amostra foi transferido para tubos de fundo cônico e incubado a 65 °C por aproximadamente 60 min, agitando-se ocasionalmente o tubo para manter o extrato ressuspendido. Posteriormente, foram retiradas três alíquotas de 1.000 µL de cada amostra (repetições) e transferidas para microtubos de 2 mL, às quais foram adicionados 1.000 µL da mistura dos solventes orgânicos clorofórmio e álcool isoamílico, respectivamente na proporção de 24:1, para extração das proteínas contidas no material vegetal. Os microtubos foram agitados manualmente por cerca de 50 vezes e centrifugados por 30 min, à velocidade de 7.000 rpm, a 4 °C.

O sobrenadante proveniente da centrifugação foi coletado e transferido para um novo microtubo contendo 1.000 µL da mistura de acetato de sódio (3M) e álcool etílico (95%) na proporção de 1:6. O material foi mantido em repouso no freezer por 2 h, a -20 °C, para a precipitação do DNA. Após esse período, os microtubos foram centrifugados por 10 min, à velocidade de 14.000 rpm, a 4 °C. A seguir, a solução de acetato de sódio foi eliminada e 1.500 µL de álcool etílico a 70% foram adicionados. As amostras ficaram por 10 min à temperatura ambiente e, logo após, foram centrifugadas por 10 min à velocidade de 4.000 rpm, a 4 °C. Após o descarte do álcool etílico, o precipitado foi seco ao ar até a completa evaporação do álcool.

Por fim, o DNA obtido foi ressuspenso em 100 μ L de solução TE (Tris-HCL 10 mM, pH 8,0 e EDTA 1 mM) e, em seguida, as três repetições foram reunidas e acondicionadas em freezer a -20 °C .

3.2.2. Eletroforese, quantificação e diluição das amostras

Logo após a extração de DNA, foi realizada eletroforese do DNA extraído em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio. A preparação dos géis foi feita a partir da dissolução da agarose (cuja quantidade depende da concentração desejada e do volume da cubeta) em solução de TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3), sob aquecimento em forno micro-ondas por cerca de 1,5 min até que a solução ficasse homogênea e transparente. Em seguida, foram adicionados 4,5 μ L de brometo de etídio.

Depois de resfriada até aproximadamente 50 °C, a solução foi vertida em uma forma ou cubeta (tipo de molde específico para o preparo do gel). Sobre a solução ainda morna, foram colocados pentes (tira de teflon denteada), que serviram como molde para produzir diversas cavidades (poços) no gel. Ao resfriar, a agarose foi polimerizada e os poços fixados. A mistura composta por 3 μ L de tampão 3X mais 3 μ L de DNA foi depositada nos poços do gel e submetida à eletroforese horizontal à 80 V por cerca de 15 min.

Quando exposto à luz ultravioleta por meio de um transiluminador, o DNA extraído foi visualizado e, em seguida, quantificado por comparação com padrão de massa molecular conhecida, utilizando-se o DNA do bacteriófago λ nas concentrações de 10, 50 e 100 ng/ μ L (Figura 4). Após a quantificação do DNA extraído, as amostras foram diluídas em água ultrapura, padronizadas a uma concentração de 3,0 ng/ μ L e armazenadas a -20 °C para subsequente uso nas reações de PCR.

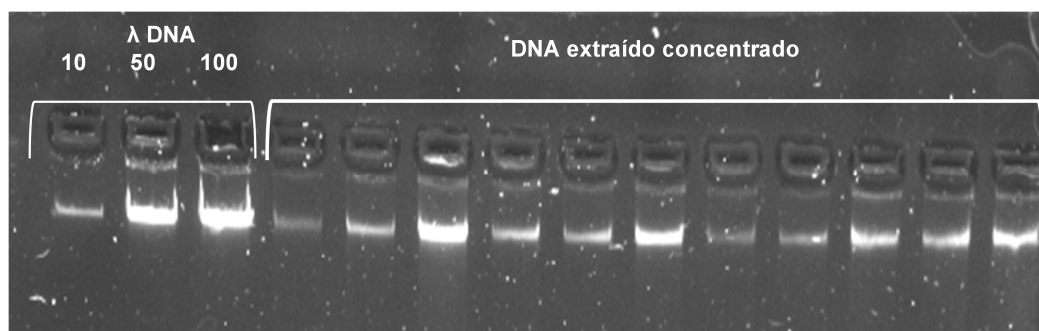


Figura 4 - Quantificação do DNA extraído em gel de agarose a 2,0 %, por comparação com padrão de massa molecular conhecida (DNA do bacteriófago λ nas concentrações de 10, 50 e 100 ng/ μ L).

3.2.3 Teste para seleção de iniciadores microssatélites e PCR

Para a genotipagem das amostras, foram testados 16 pares de *primers* marcados com corantes fluorescentes 6-FAM (*6-carboxyfluorescein*) de coloração azul ou HEX (*hexachloro-6-carboxyfluorescein*) de coração verde (Tabela 2), desenvolvidos por Rodrigues (2009) no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, segundo protocolo descrito por Rafalski et al. (1996), os quais foram utilizados para realização PCR e posterior eletroforese capilar em sequenciador automático de DNA (ABI 3730).

As reações de PCR foram realizadas separadamente para cada loco, em placas que continham 0,7 ng de DNA, 0,25 mg/mL de BSA (*Bovine serum albumin*), 0,2 µM de cada primer (*forward* e *reverse*), 1x de tampão para PCR (10 mM de Tris-HCl; pH 8,3; 50 mM de KCl), 0,25 mM de dNTP e 1 U de Taq polimerase e água ultrapura estéril, totalizando um volume final de reação de 13,0 µL.

O material resultante foi amplificado em termociclador Veriti (*Applied Biosystems*), no qual as amostras foram inicialmente submetidas à desnaturação a 94 °C por 1 min, seguida por 35 ciclos de amplificação. A cada ciclo, as amostras sofreram em cadeia as etapas de desnaturação a 95 °C, anelamento a diferentes temperaturas e extensão a 72 °C, por 1 min cada uma delas. Após os ciclos de reação, o processo foi encerrado com uma extensão final a 72 °C por 20 min, seguida de resfriamento a 12 °C. Os produtos das PCR foram visualizados em gel de agarose a 2,0% e, em seguida, diluídos em água ultrapura na proporção de 1:1.

3.2.4 Eletroforese capilar em sequenciador automático

Sistemas ou conjuntos *multiplex* compostos por dois ou três locos foram montados utilizando-se *primers* marcados com diferentes ou um mesmo fluorocromo, mas com amplitudes alélicas distintas. Esses sistemas foram misturados a 11 µL de um coquetel que contém 10 µL de formamida HiDi e 1 µL de marcador interno *carboxy-X-rhodamine* (ROX), desenvolvido por Brondani e Grattapaglia (2001). A mistura resultante foi desnaturada por 5 min a 95 °C. Em seguida, foi realizada a separação dos fragmentos em analisador automático de DNA (ABI 3730).

Tabela 2 - Temperatura de anelamento (Ta), motivos de repetição, amplitude alélica (pb) e fluorescência de iniciadores microssatélites testados para caracterização genética das populações de *H. speciosa*.

Iniciador	Ta (°C)	Motivos de repetição	Amplitude alélica (pb) ¹	Fluorescência
HS 01	56	(GCA) ₆ (TC) ₂₀ (GCA) ₈	250 a 310	HEX
HS 03	56	(CT) ₅ (CT) ₆	120 a 180	6-FAM
HS 05	56	(GA) ₁₅ (TGC) ₆	200 a 300	HEX
HS 06	54	GA ₁₄	100 a 150	HEX
HS 08	52	(CA) ₆ (CT) ₁₇	200 a 250	6-FAM
HS 09	56	(CT) ₇ (CT) ₁₀ (CT) ₆	200 a 300	6-FAM
HS 10	56	(CT) ₁₄ (CT) ₈	100 a 200	HEX
HS 11	56	(GA) ₁₇	100 a 200	6-FAM
HS 16	54	(GA) ₁₂	100 a 150	6-FAM
HS 17	56	(GA) ₁₆	100 a 200	HEX
HS 18	56	(AG) ₁₄	300 a 350	6-FAM
HS 20	56	(CT) ₁₁	200 a 250	HEX
HS 27	54	(GA) ₁₄	100 a 150	6-FAM
HS 30	56	(AG) ₁₀	180 a 200	HEX
HS 32	56	(CT) ₉	200 a 300	6-FAM
HS 33	56	(AG) ₂₄	80 a 120	6-FAM

¹ pb = Pares de base.

3.3 Análise de dados

3.3.1 Detecção dos picos de fluorescência e genotipagem dos indivíduos

A detecção dos picos de fluorescência e a genotipagem foram realizadas por meio do *software* GeneMapper versão 4.1 (*Applied Biosystems*) (Figura 5). A partir dos genótipos obtidos, foram estimados todos os parâmetros utilizados nas análises. Os dados genotípicos em pares de bases com duas casas decimais de precisão foram ajustados para classes alélicas definidas com o *software* AlleloBin (PRASANTH et al., 2006), o qual permite implementar um método de minimização com base em quadrados mínimos, descrito por Idury e Cardon (1997).

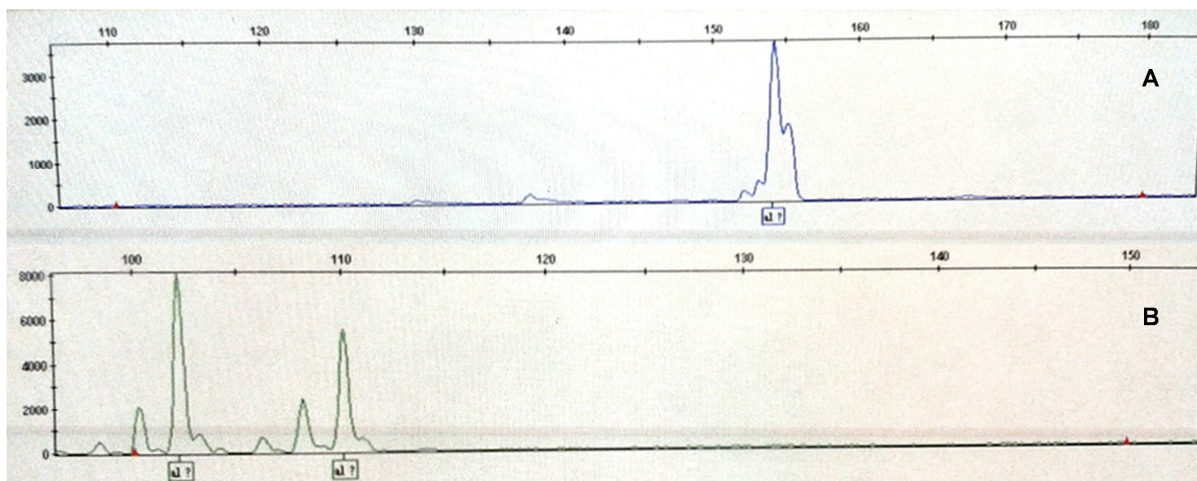


Figura 5 - Genotipagem de indivíduos homozigoto (A) e heterozigoto (B) de *H. speciosa* para o loco analisado por meio do *software* GeneMapper.

3.3.2 Detecção de alelos nulos

A verificação da presença de alelos nulos e de sua interferência nas frequências alélicas foi realizada com o *software* Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). Esse *software* utiliza simulações de Monte Carlo (*bootstrap*) e se baseia na teoria de equilíbrio de Hardy-Weinberg para detectar diferenças entre frequências observadas e esperadas de homozigotos e estimar a frequência de quaisquer alelos nulos (VAN OOSTERHOUT et al., 2003, 2004).

Para tanto, utilizou-se um intervalo de confiança de 95% e realizaram-se 1.000 simulações de Monte Carlo. A equação 1 de Brookfield (1996) foi empregada para estimar a frequência de alelos nulos, que se baseia no déficit de heterozigotos e é considerada mais adequada para situações em que existem amostras com falhas e se desconhece o motivo, podendo ser devido a alelos nulos, falhas na PCR ou problemas de degradação do DNA (VAN OOSTERHOUT et al., 2003, 2004).

3.3.3 Caracterização da variabilidade genética intra e interpopulacional

Para a análise descritiva da diversidade genética intrapopulacional, utilizou-se o *software* GDA (*Genetic Data Analysis*) (LEWIS; ZAYKIN, 2002), com o qual foram estimados os seguintes parâmetros: número de alelos por loco (A), número de alelos privados (A_p), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e) e coeficiente de endogamia das populações (f). Avaliou-se a consistência

das estimativas do coeficiente de endogamia pelo método de *bootstrap*, utilizando-se para isso 10.000 reamostragens e intervalo de confiança de 95% (WEIR, 1996).

A riqueza alélica (R) e as frequências alélicas foram calculadas por meio do software FSTAT (GOUDET, 1995). Kimura (1983) define como alelos raros aqueles com frequência inferior a um valor pequeno e pré-definido, sendo frequentemente utilizado o valor de 5% (SEBBENN et al., 2000; KAGEYAMA et al., 2003, RODRIGUES, 2013). Assim, consideram-se alelos raros aqueles com frequência relativa inferior a 5%.

Testes para detecção de desequilíbrio de ligação e de equilíbrio de Hardy Weinberg foram realizados com base em permutações alélicas dentro das populações por meio do *software* FSTAT (GOUDET, 1995), uma vez que este faz a correção de Bonferroni.

Já para a caracterização da variabilidade genética interpopulacional, foram estimados os parâmetros de Weir e Cockerham (1984), tais como: índice de fixação total (F_{IT}), divergência genética entre populações (F_{ST}) e índice de fixação dentro das populações (F_{IS}). Também foram determinados outros índices análogos ao F_{ST} , como G_{ST} (NEI, 1973), que assume um modelo de alelo infinito, e R_{ST} (SLATKIN, 1995), que é baseado no tamanho do alelo e leva em consideração o modelo *stepwise mutation model*. As consistências dos dados foram realizadas pelo método *bootstrap* para todos os locos, com intervalo de confiança de 99%.

Visando determinar os padrões de distribuição da variabilidade e diferenciação genética entre as populações de *Hancornia speciosa*, realizou-se análise de variância molecular (AMOVA) utilizando-se o *software* Arlequin v. 3.1 (EXCOFFIER et al., 2006), que divide a variação molecular em três componentes ou níveis hierárquicos: entre estados diferentes, entre populações de cada estado e dentro de cada população. A significância foi testada com 1.000 permutações.

Com auxílio também do programa Arlequin v. 3.1 (EXCOFFIER et al., 2006) foi calculada uma matriz de pares de F_{ST} (WEIR; HILL, 2002) para as seis populações, bem como estimou-se o fluxo gênico médio pela fórmula $Nm = (1 / F_{ST} - 1) / 4$ (WHITLOCK; MCCAULEY, 1999) e o número absoluto de migrantes entre populações ($M = 2Nm$).

3.3.4 Estrutura genética populacional

A inferência da estrutura populacional, do número de populações ou agrupamentos existentes (K) e da atribuição dos indivíduos amostrados a cada grupo foi feita por meio do *software* Structure v. 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000; HUBISZ et al., 2009), o qual utiliza dados de genótipos multilocos com uma abordagem Bayesiana *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) e admite mistura de genomas. Foram estimados valores de K, variando de 1 a 9,

com 1.000.000 de reamostragens (sendo as 250.000 mil primeiras descartadas) e 20 iterações. Para detecção do número de grupos mais provável, utilizou-se a estatística ΔK , descrita por Evanno et al. (2005), que se baseia na taxa de variação da probabilidade log de dados entre sucessivos valores K. O valor de K que melhor representa a estrutura populacional pode ser identificado pelo valor máximo de ΔK .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Iniciadores microssatélites selecionados

Foram selecionados 11 pares de *primers* (HS01, HS03, HS05, HS06, HS08, HS10, HS11, HS16, HS27, HS30 E HS33), dos 16 testados, por permitirem a amplificação de fragmentos com bandas nítidas e consistentes, observadas em gel de agarose, e a amplificação de fragmentos com potencial para utilização em estudos de genética de populações (Tabela 2). As temperaturas de anelamento ideais, definidas para cada loco, variaram de 52 a 56 °C.

4.2 Alelos nulos, equilíbrio de Hardy-Weinberg e equilíbrio de ligação

As estimativas das frequências de alelos nulos obtidas foram significativas (valores $> 0,20$), para os locos HS01, HS05, HS16 dos 11 selecionados, conforme Tabela 3. Valores abaixo de 0,20 são aceitáveis para marcadores microssatélites (RODRIGUES, 2013). Alelos nulos surgem quando ocorre uma mutação no DNA alvo, precisamente na sequência homóloga à sequência do *primer* utilizado na reação de PCR. Isso reduz ou inibe completamente a capacidade de anelamento do iniciador com a fita molde (CALLEN et al., 1993). Esses alelos mutantes não são visíveis nos géis submetidos às técnicas de revelação de bandas normalmente utilizadas para produtos de PCR separados por eletroforese. A presença desses alelos pode levar a estimativas errôneas.

Contudo, as frequências de alelos nulos dos locos HS03 e HS30 não puderam ser devidamente estimadas e interpretadas, visto que esses locos apresentaram poucos alelos, não sendo possível analisá-los corretamente (Tabela 3). Com marcadores microssatélites, busca-se usar apenas locos polimórficos, obtendo-se geralmente valores altos de diversidade genética. A presença de locos monomórficos pode alterar a média das populações, subestimando os valores de variabilidade obtidos nas análises, passando a impressão de que as populações têm baixa diversidade. Assim, com o objetivo de minimizar possíveis erros, os locos HS03 e HS30 foram desconsiderados nas análises seguintes. No entanto, por apresentarem locos polimórficos e frequência de alelos nulos significativa para no máximo três populações, os locos HS01, HS05 e HS16 não foram descartados.

Nenhum loco apresentou desvio nas proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg bem como os testes de probabilidade de desequilíbrio de ligação em todas as populações

não mostraram associações entre os locos, o que sugere que as análises podem ser realizadas assumindo-se a independência estatística entre os locos.

Tabela 3 - Frequência de alelos nulos¹ dos 11 locos com potencial para utilização em estudos de genética populacional das seis populações naturais de *H. speciosa*.

Locos	Populações					
	Reserva do Caju	Abaís	Barra dos Coqueiros	Jacarecoara	Tapera	Tamandaré
HS01	0,248*	0,197	0,347*	0,0994	-0,032	0,217*
HS03	0	0	0,042	0	0	-0,029
HS05	0,195	0,016	0,165	0,277*	0,359*	0,081
HS06	0,064	0,020	0,024	0,022	0,070	-0,037
HS08	-0,069	-0,036	0,055	-0,005	0,180	0,023
HS10	0,067	0,068	-0,041	-0,020	0,008	-0,002
HS11	0,064	0,020	0,024	0,022	0,070	-0,037
HS16	0,056	0,020	0,115	0,002	0,244*	-0,036
HS27	-0,012	-0,026	0,014	0,031	-0,044	0,111
HS30	0	0	0	0	-0,012	0
HS33	0,127	0,020	0,062	0,030	0,195	0,003

¹ Estimador número 1 Brookfield (1996); * = Valores maiores do que 0,20 foram considerados significativos.

4.3. Variabilidade Genética

As populações Reserva do Caju, Abaís, Barra dos Coqueiros, Jacarecoara, Tapera e Tamandaré apresentaram, respectivamente, 5,11; 5,56; 4,56; 5,00; 4,33 e 3,56 alelos, em média, por loco. As populações Reserva do Caju e Abaís foram as que revelaram maiores médias em relação ao número de alelos (Tabela 4).

Verifica-se que o número de alelos (A) observado para todas as populações avaliadas foi baixo, bem como as diferenças quanto ao número de alelos entre as populações foram pequenas. Entretanto, deve-se considerar que tais diferenças podem representar muito para a futura adaptação de populações com atuais níveis baixos de variabilidade genética entre indivíduos (DINIZ-FILHO et al., 2012). Observou-se ainda uma relação direta entre o tamanho amostral e o número médio de alelos, isto é, os locos com

maior número de indivíduos amostrados foram em geral os que apresentam valores mais elevados em relação ao número médio de alelos. É provável que esses resultados estejam relacionados ao tamanho amostral, uma vez que o número de alelos é afetado pelo tamanho das amostras (KALINOWSKI, 2004; RODRIGUES, 2013).

Tabela 4 - Médias de tamanho amostral (n), número de alelos (A), riqueza alélica (R), alelos privados (Ap), heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho) e coeficiente de endogamia (f) em relação aos nove locos avaliados para as seis populações de *H. speciosa*.

Populações	n	A	R	Ap	He	Ho	f	IC
Reserva do Caju	18,22	5,11	3,42	5	0,58	0,43	0,26	0,11 a 0,42*
Abaís	19,33	5,56	3,31	2	0,57	0,50	0,12	0,03 a 0,25*
Barrados Coqueiros	19,00	4,56	2,99	5	0,49	0,35	0,30	0,10 a 0,53*
Jacarecoara	12,78	5,00	4,03	4	0,72	0,61	0,16	0,06 a 0,34*
Tapera	5,78	4,33	4,11	1	0,67	0,41	0,40	0,22 a 0,60*
Tamandaré	13,89	3,56	2,93	1	0,56	0,49	0,12	0,01 a 0,31*
Total				18				
Média	14,83	4,69	3,47	3,00	0,60	0,47	0,23	

¹ IC = Intervalo de Confiança; * = significativo a 95% de probabilidade, com base em 10.000 reamostragens bootstrap.

Porém, ao compararmos os resultados de riqueza alélica (R), parâmetro de medida do número de alelos independente do tamanho das amostras, que permite comparar populações de tamanhos distintos, constatou-se, então, que as populações Reserva do Caju, Abaís, Barra dos Coqueiros, Jacarecoara, Tapera e Tamandaré apresentaram, respectivamente, 3,42; 3,31; 2,99; 4,03; 4,11 e 2,93 alelos, em média, por loco; e que, nesse caso, as populações Tapera e Jacarecoara foram as que revelaram maiores valores médios de números de alelos. Esses resultados, portanto, reforçam a hipótese de que o parâmetro número de alelos é afetado pelo tamanho amostral.

As populações Tamandaré, Tapera, Jacarecoara, Barra dos Coqueiros, Abaís e Reserva do Caju apresentaram, respectivamente, 1, 1, 4, 5, 2 e 5 alelos privados, ou seja, aqueles encontrados apenas em uma população (Tabela 4). Assim, foram observados alelos privados para todas as populações, num total de 18 alelos. O maior número de alelos privados (5) foi apresentado pelas populações Reserva do Caju e Barra dos Coqueiros.

Verificou-se maior heterozigosidade média observada (H_o) para as populações Jacarecoara, Tamandaré e Abaís, cujos valores foram respectivamente 0,61; 0,50 e 0,49, e menor para as populações Barra dos Coqueiros, Tapera e Reserva do Caju, com valores respectivamente de 0,35; 0,41 e 0,43 (Tabela 4). Já os valores da heterozigosidade média esperada (H_e) variaram de 0,49 a 0,72. As maiores médias foram obtidas para as populações Jacarecoara (0,72), Tapera (0,67) e Reserva do Caju (0,58). Os menores valores médios, por sua vez, foram observados para as populações Barra dos Coqueiros (0,49), Tamandaré (0,56) e Abaís (0,57). Desse modo, nota-se que os valores médios de heterozigosidade observada foram inferiores aos da heterozigosidade esperada, indicando um excesso no número de homozigotos para todas as populações. Constatou-se também que, quando analisadas em relação aos parâmetros riqueza alélica, heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada, houve um padrão de menor variabilidade genética para a população Barra dos Coqueiros (Sergipe) e de maior variabilidade para a população Jacarecoara (Ceará).

Todas as populações apresentaram valores médios de coeficientes de endogamia (f) positivos (Tabela 4). A população Tapera foi a que obteve o maior valor médio (0,40), seguida por Barra dos Coqueiros (0,30) e Reserva do Caju (0,26). Os intervalos de confiança do coeficiente de endogamia para estas populações foram positivos, o que indica existir consistência nas estimativas dos dados. Todavia, as populações, Abaís, Tamandaré e Jacarecoara foram as que apresentaram os menores valores médios, respectivamente 0,12; 0,12 e 0,16, com intervalos de confiança indicando que estes valores também foram consistentemente diferentes de zero.

Em geral, coeficiente de endogamia positivo revela excesso de homozigotos e menor proporção de heterozigotos com relação à esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Logo, os coeficientes de endogamia aqui estimados sugerem que as populações avaliadas são endogâmicas, apresentando excesso de homozigotos (GILLESPIE, 1998; RODRIGUES, 2013), ausência de cruzamento aleatório e existência de fatores influenciando a aleatoriedade alélica (FUTUYMA, 2002). É de amplo conhecimento que, mesmo em espécies alógamas, o equilíbrio de Hardy-Weinberg deixa de existir na presença de cruzamentos preferenciais, o que pode resultar em uma estruturação dentro da população (FARIAS, 2010).

Os valores médios de heterozigosidade observada, heterozigosidade esperada e coeficiente de endogamia obtidos, neste estudo, acham-se dentro dos padrões relatados para populações de *H. speciosa*, sendo semelhantes aos encontrados por Costa et al. (2012). Contudo, ao comparar-se os resultados aqui encontrados àqueles obtidos por Souza et al. (2010), constatou-se que o valor de heterozigosidade média observada foi maior que o encontrado por esses autores, indicando que a população por eles estudada apresentava

menor proporção de indivíduos heterozigotos, podendo resultar em altos valores de coeficiente de endogamia e menor diversidade genética. Estudos realizados com açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) (OLIVEIRA et al., 2010), goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*) (SANTOS et al., 2011) e camu-camu (*Myrciaria dubia* [H.B.K.] McVaugh) (ROJAS GANZALEZ et al., 2011) demonstraram também que, a exemplo da mangabeira que é uma espécie alógama, é comum encontrar coeficiente de endogamia positivo em populações naturais de espécies arbóreas tropicais.

Analisando as distribuições de frequências alélicas dos nove locos para as populações de *H. speciosa* (Figuras 6 a 11), verificou-se que a maioria é do tipo modal ou bimodal. Observa-se também que a maior parte dos locos apresentou distribuição pouco uniforme e com frequência superior a 0,50, quais sejam: HS01, HS06, HS08, HS10, HS11, HS16, HS27 e HS33 para a população Reserva do Caju; HS01, HS05, HS08, HS10 e HS27 para Abaís; HS01, HS06, HS10, HS11, HS16, HS27 e HS33 para Barra dos Coqueiros; HS08 e HS27 para Jacarecoara; HS01, HS05 e HS27 para Tapera; e HS01, HS10 e HS27 para Tamandaré. Com base nesses resultados, constata-se que as populações Reserva do Caju, Abaís e Barra dos Coqueiros, naturais do Estado de Sergipe, revelaram maior número de locos com frequência superior a 0,50, indicando que tais populações podem ter sofrido redução na diversidade genética devido a variações aleatórias na frequência gênica, com alguns alelos provavelmente tendo sido fixados e outros perdidos.

Verificou-se também que o alelo 118, ocorrendo apenas no loco HS27, apresentou frequências superiores a 0,67 para todas as populações, com valores variando de 0,68 a 0,93. É notório que alelos com frequências altas (próximas a 1) têm grande chance de serem fixados, em decorrência de diversos fatores, como fragmentação florestal, forma de polinização e hábito dos polinizadores, cruzamento preferencial, deriva genética, ausência de fluxo gênico e seleção natural (SLATKIN, 1987; STEARNS, 1992; HARTL; CLARK, 1997; SOUZA et al., 2004; GUEDES, 2008; RODRIGUES, 2013). Por isso, sugere-se realizar estudos específicos visando analisar a ocorrência do alelo 118 nas variedades botânicas de *H. speciosa* e a sua expressão gênica, a fim de verificar a importância deste para a espécie.

Em função do total de alelos por população ilustrados nas Figuras 6 a 11, foram determinadas as porcentagens de alelos raros para cada uma das seis populações (Figura 12). Observou-se o maior percentual de alelos raros na população Abaís (22%); não sendo encontrado alelo raro na população Tapera (0%). A incidência de alelos raros em cinco das seis populações estudadas, adicionado ao fato de terem sido observados alelos privados (Tabela 4) em todas as populações, sugere que a variabilidade apresenta-se dispersa, tornando estas populações complementares quanto à manutenção da diversidade genética da espécie (SANTOS et al., 2011).

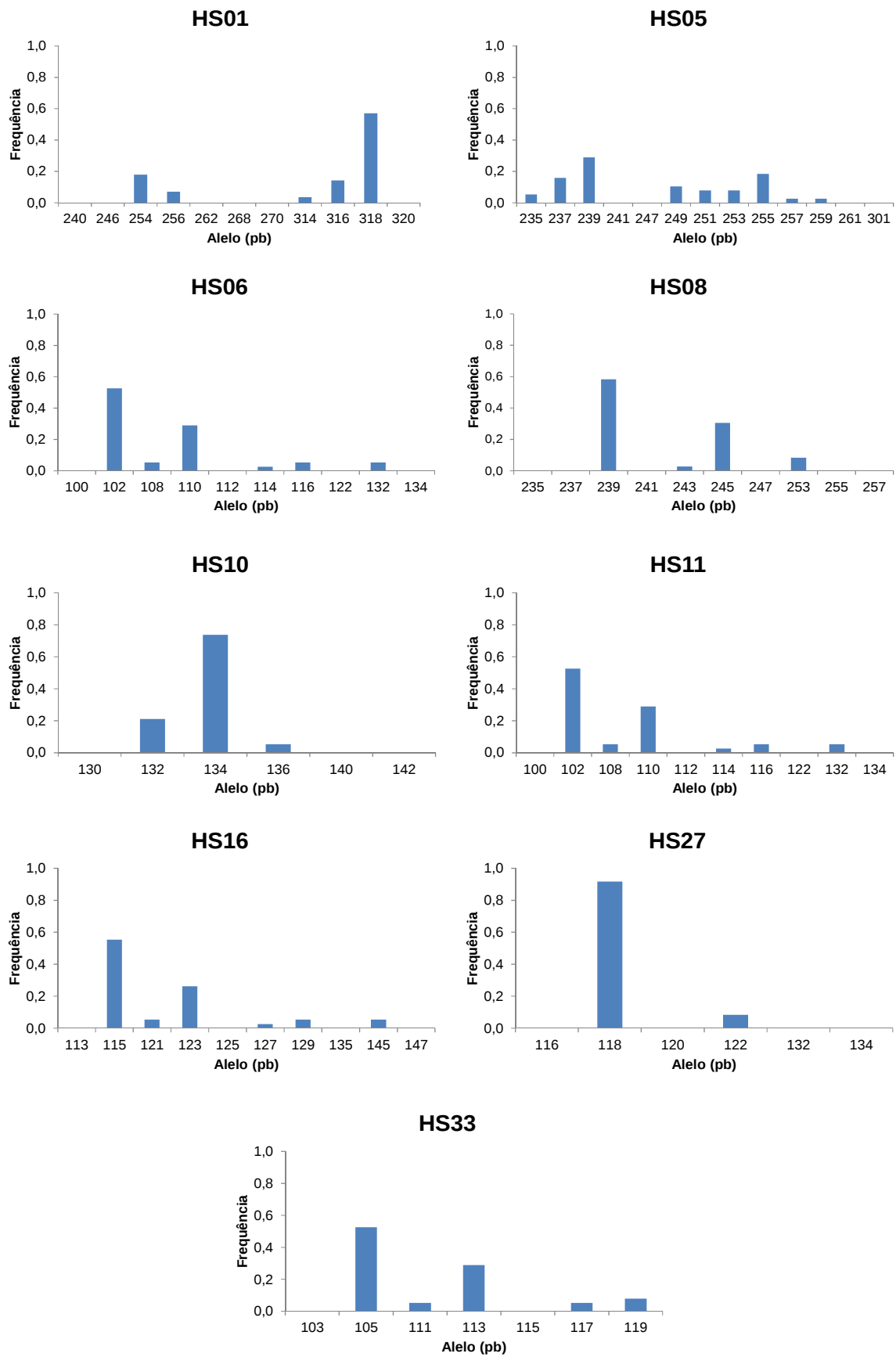


Figura 6 - Distribuição das frequências alélicas dos nove locos analisados para a população Reserva do Caju.

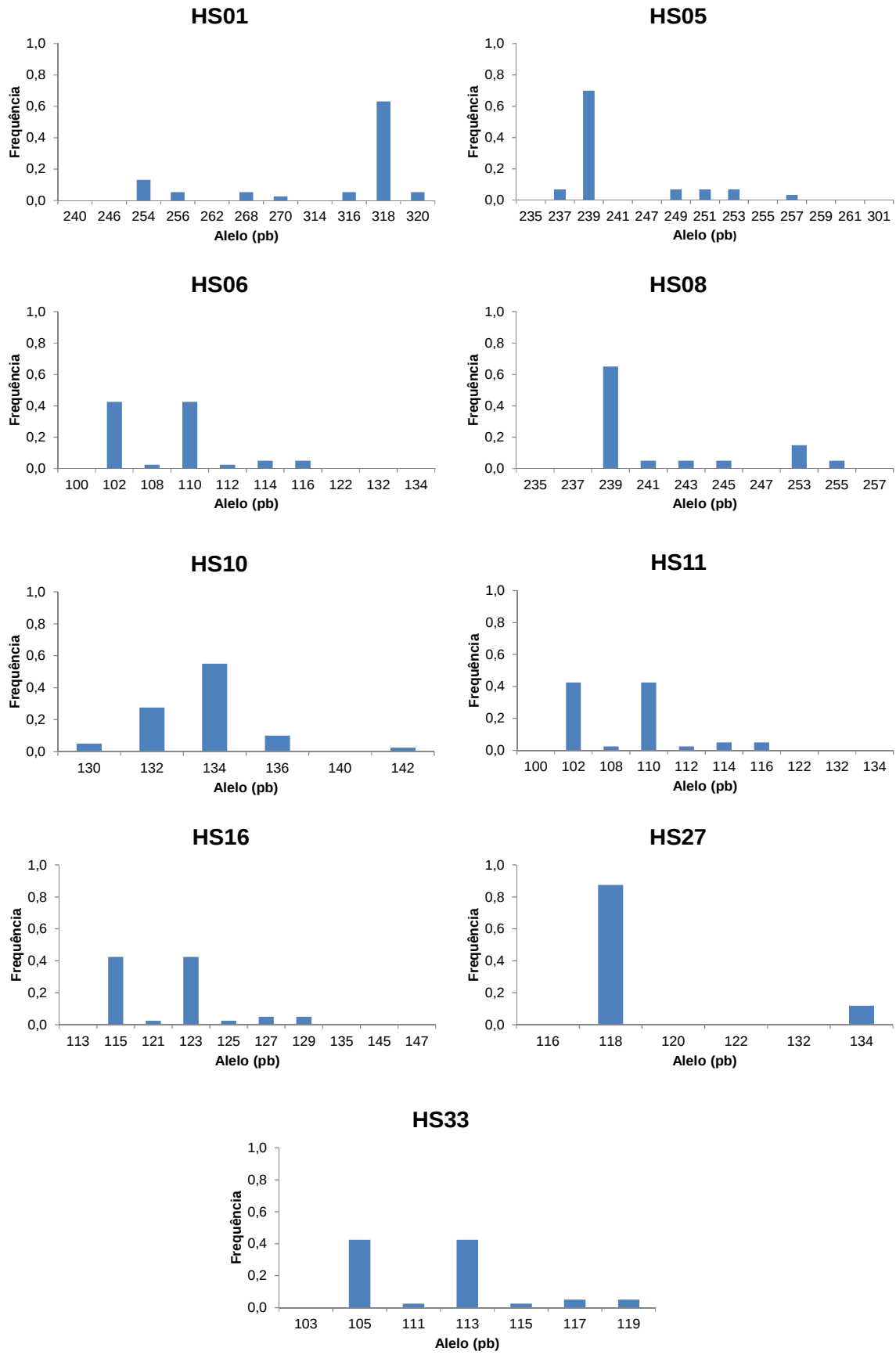


Figura 7 - Distribuição das frequências alélicas dos nove locos analisados para a população Abaís.

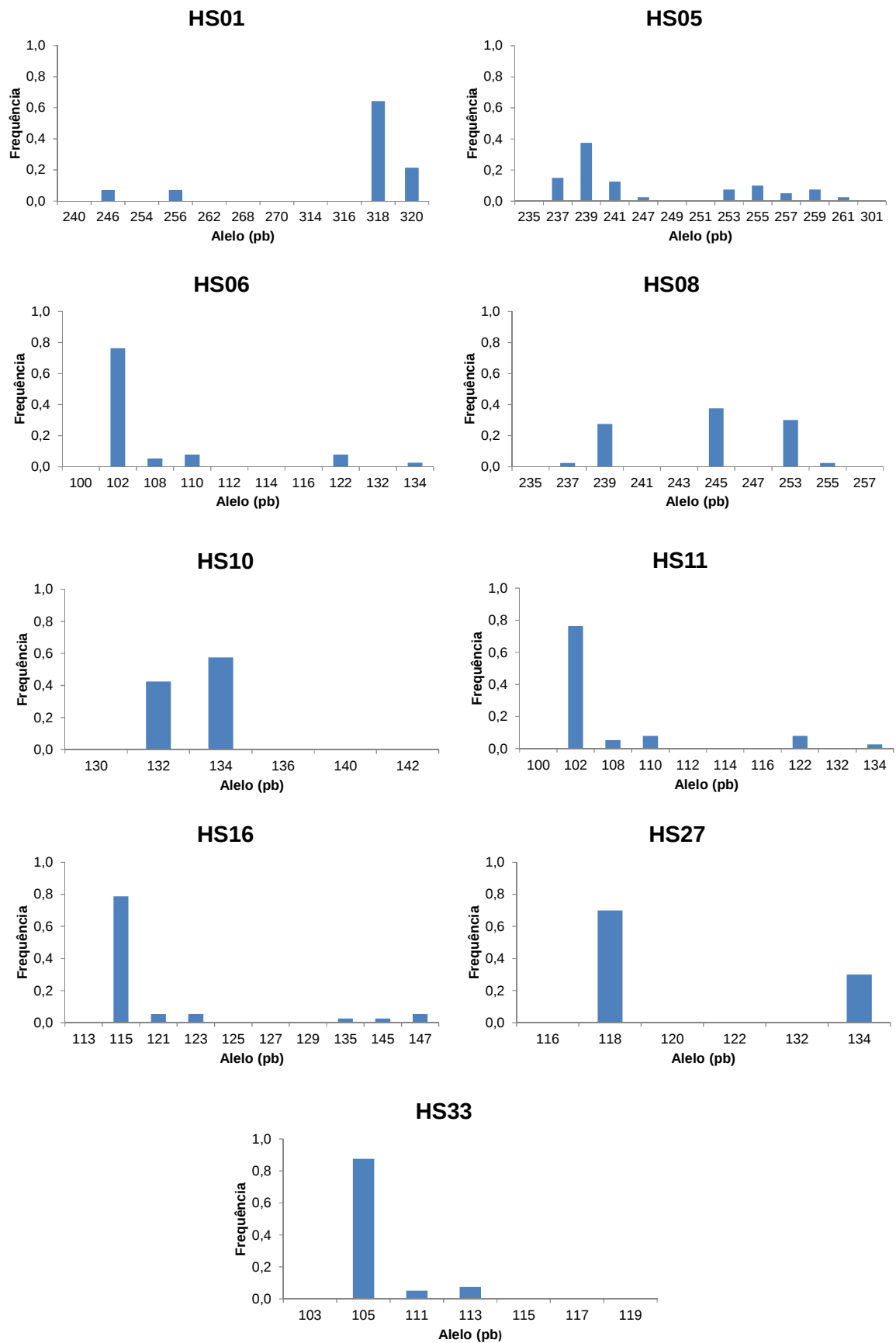


Figura 8 - Distribuição das frequências alélicas dos nove locos analisados para a população Barra dos coqueiros.

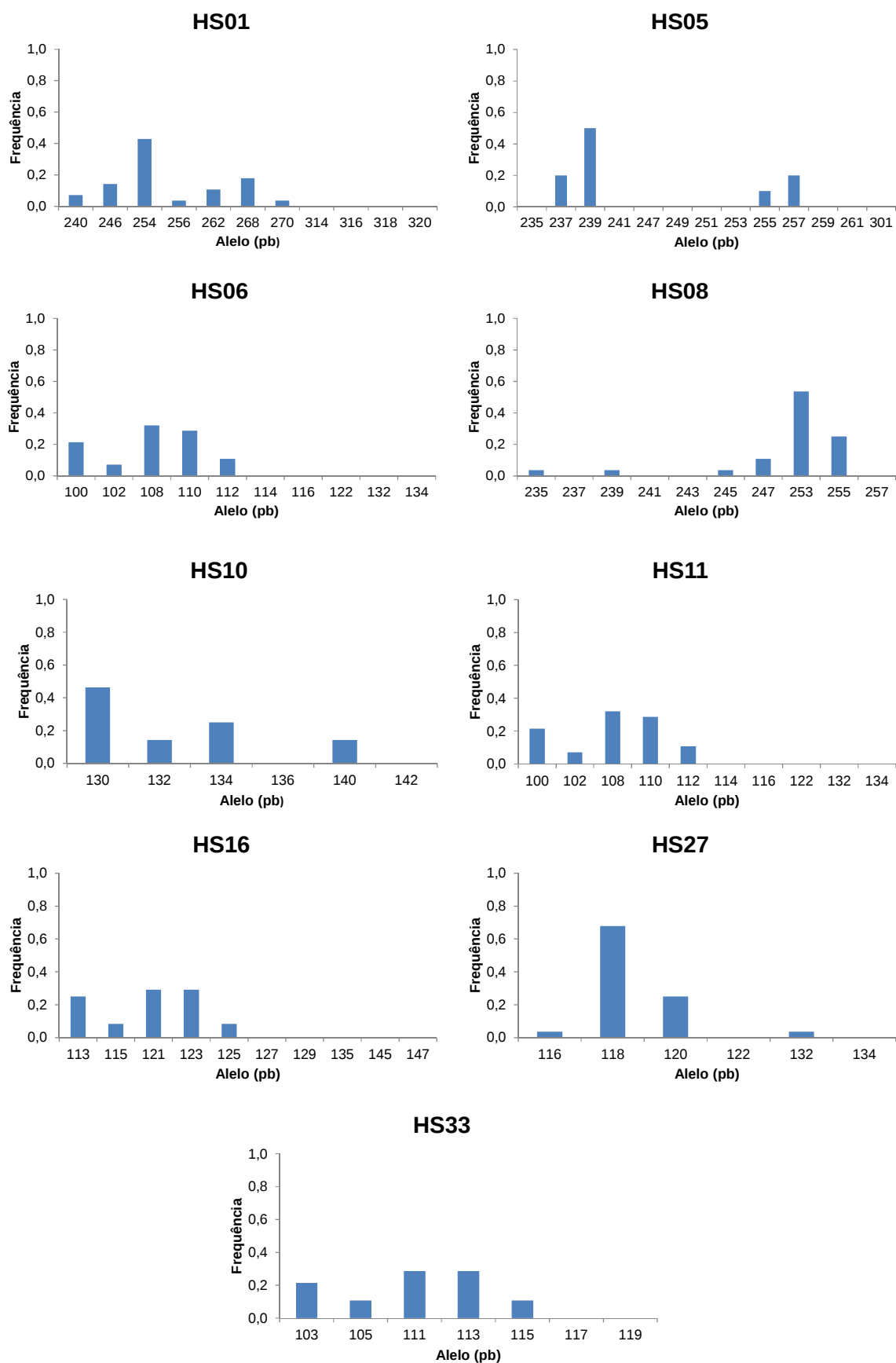


Figura 9 - Distribuição das frequências alélicas dos nove locos analisados para a população Jacarecoara.

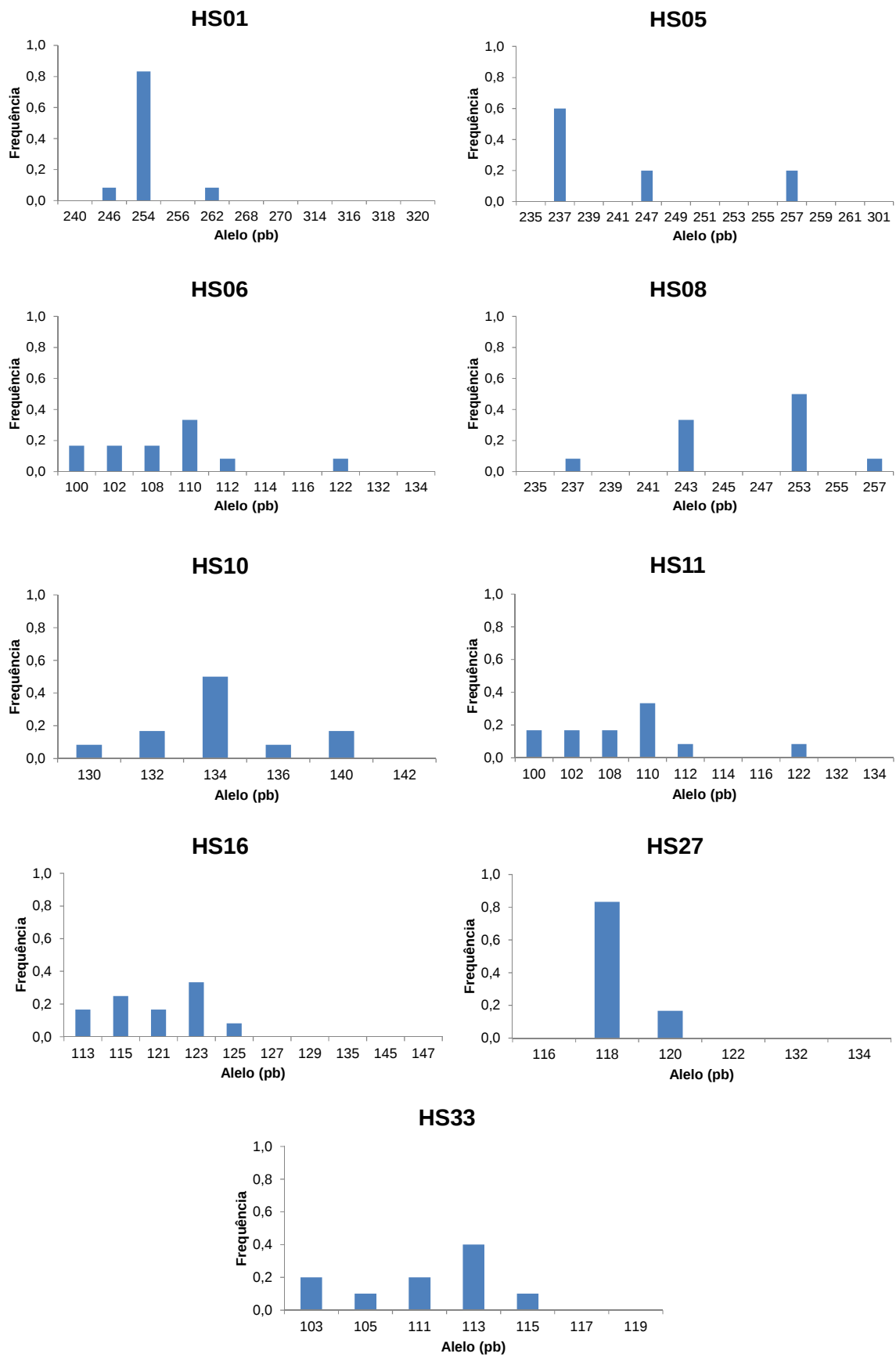


Figura 10 - Distribuição das frequências alélicas dos nove locos analisados para a população Tapera.

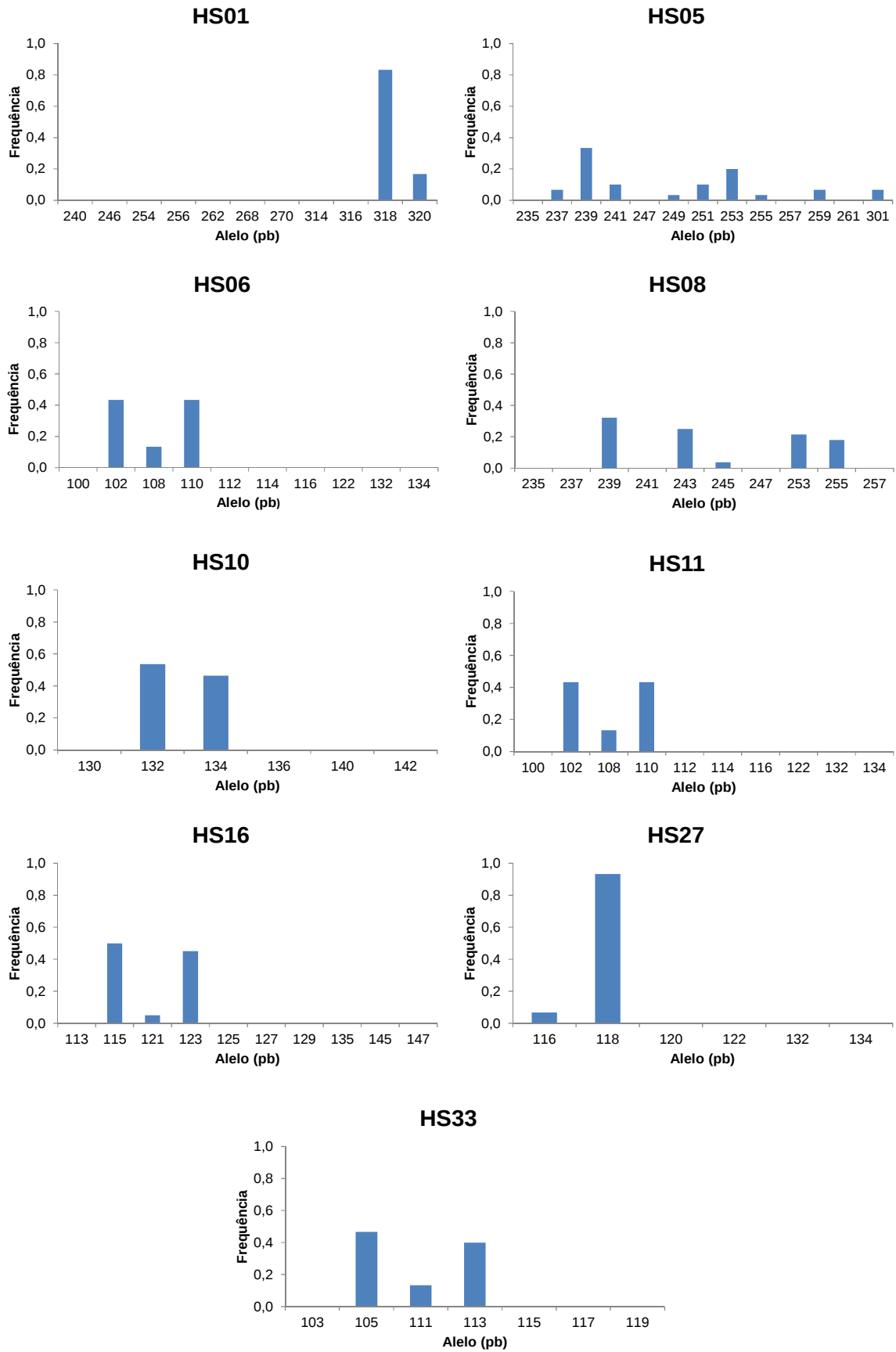


Figura 11 - Distribuição das frequências alélicas dos nove locos analisados para a população Tamandaré.

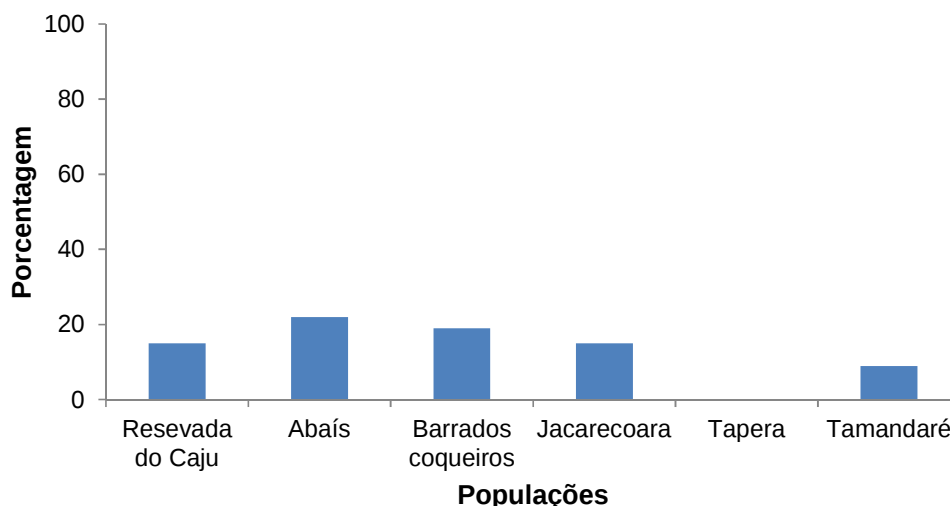


Figura 12 - Porcentagens de alelos raros para cada uma das seis populações de *H. speciosa*.

De acordo com Wright (1969), valores de F_{ST} menores que 0,05 indicam baixa diferenciação genética entre populações; entre 0,05 e 0,15, moderada; maior que 0,15 e igual a 0,25, alta; e acima de 0,25, muito alta. Os índices de diversidade genética obtidos para os três estados foram altamente significativos ($p < 0,01$), com valores de G_{ST} , F_{ST} e R_{ST} iguais a 0,14 (Tabela 5), revelando, assim, moderada diferenciação genética entre estes, além de consistência nos resultados obtidos. Diversidade semelhante foi obtida quando os mesmos índices foram estimados apenas para as três populações do Estado de Sergipe ($G_{ST} = 0,07$; $F_{ST} = 0,07$ e $R_{ST} = 0,05$). Verificou-se, por sua vez, baixa diferenciação genética entre as duas populações do Estado do Ceará ($G_{ST} = 0,01$; $F_{ST} = 0,01$ e $R_{ST} = -0,05$).

Tabela 5 - Índices de diversidade genética entre populações (G_{ST} , F_{ST} , R_{ST}), índice de fixação total (F_{IT}) e índice de fixação dentro das populações (F_{IS}) obtidos para diferentes grupos de populações de *H. speciosa*.

Grupo (Tamanho)	G_{ST}	R_{ST}	F_{ST}	F_{IT}	F_{IS}
Estados (3)	0,14	0,14	0,14**	0,34**	0,23**
Sergipe (3)	0,07	0,05	0,07**	0,28**	0,23**
Ceará (2)	0,01	-0,05	0,01 ^{ns}	0,26**	0,24**

** Altamente significativo ($p < 0,01$) e ^{ns} = não significativo.

Esses resultados são reforçados pela análise de comparação de F_{ST} para pares de populações (Tabela 6), a qual revela que os valores de F_{ST} entre os pares Reserva do Caju x Abaís, Reserva do Caju x Barra dos coqueiros e Abaís x Barra dos coqueiros foram respectivamente (0,011; 0,089 e 0,143), indicando moderada diferenciação genética, dado que o valor 0,011 entre as populações Reserva do Caju e Abaís foi não significativo ($p > 0,05$). O menor valor de F_{ST} foi observado entre as populações Jacarecoara e Tapera (0,005), valor esse também não significativo ($p > 0,05$). Já o maior valor foi encontrado para os pares de populações Barra dos Coqueiros x Jacarecoara (0,287). A população Jacarecoara, com valores de pares de F_{ST} variando de 0,005 a 0,287, apresentou-se como a mais divergente em relação às demais. Esses resultados podem servir de orientação na escolha de parentais a serem utilizados em programas de melhoramento genético.

Ao analisar o número absoluto de migrantes estimado ($M = 2Nm$), que permite inferir sobre o fluxo gênico (Nm), ou seja, quantidade de indivíduos migrantes entre populações por geração, observou-se que os valores máximo e mínimo obtidos foram iguais a 102,399 e 1,244, respectivamente entre as populações Jacarecoara e Tapera e as populações Jacarecoa e Barra dos Coqueiros (Tabela 6). Resultados que corroboram os valores máximos e mínimos de F_{ST} para pares de população, uma vez que quanto menor a distância genética entre as populações, maior tende a ser o fluxo gênico entre elas (MANGARAVITE, 2012).

Tabela 6 - Matriz de divergência correlacionando F_{ST} (índice de divergência genética, diagonal abaixo) e $M = 2Nm$ (número absoluto de migrantes, diagonal acima) entre as populações de *H. speciosa*.

	Reserva do Caju	Abaís	Barra dos Coqueiros	Jacarecoara	Tapera	Tamandaré
Reserva do Caju	-	44,196	5,089	1,795	3,079	9,210
Abaís	0,011 ^{ns}	-	2,988	2,295	4,446	24,824
Barra dos Coqueiros	0,089*	0,143*	-	1,244	1,560	3,053
Jacarecoara	0,218*	0,179*	0,287*	-	102,399	2,958
Tapera	0,140*	0,101*	0,243*	0,005 ^{ns}	-	7,745
Tamandaré	0,051*	0,020 ^{ns}	0,141*	0,145*	0,061*	-

^{ns} = não significativo e * = significativo ($p < 0,05$).

Portanto, os pares de populações Jacarecoara x Tapera e Reserva do Caju x Abaís apresentaram as menores divergências genéticas, enquanto os pares Barra dos coqueiros x

Jacarecoara e Barra dos coqueiros x Tapera foram os mais divergentes. Isso pode ser explicado pelo fato de Jacarecoara e Tapera serem populações originárias do mesmo estado, isto é, do Ceará; assim como Reserva do Caju e Abaís que são de Sergipe. Já as populações Jacarecoara e Tapera em relação à população Barra dos coqueiros se encontram em estados diferentes e geograficamente distantes, o que sugere a existência de relação entre distância genética e geográfica. O conhecimento da composição genética de uma espécie e da forma como ela está organizada ou estruturada em suas populações é essencial para as ações de manejo e conservação. Entretanto, é importante entender se a estruturação genética encontrada é uma característica natural da espécie estudada ou é resultado da presença de barreiras físicas causadas pelo homem, como no caso de fragmentação do habitat (GALETTI JÚNIOR et al., 2008).

Os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) indicam que a maior porcentagem de variação foi devida a divergências dentro de populações (83,18%), verificando-se 10,82% de variação entre estados diferentes e 6,00% entre populações de cada estado (Tabela 7). Resultados semelhantes de variação dentro de populações, obtidos em estudos realizados por Costa et al. (2011) e Moura et al. (2011), corroboram estes dados.

Tabela 7 - Distribuição da variabilidade genética de *H. speciosa* com base na análise de variância molecular (AMOVA) de nove locos.

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Variância (%)	Valor- P
Entre estados	2	47,59	0,34	10,82	< 0,001
Entre populações dentro de estados	3	25,16	0,19	6,00	< 0,001
Dentro de populações	182	450,12	2,63	83,18	< 0,001
Total	187	522,87	3,16		

4.4 Estrutura genética populacional

Com base na análise Bayesiana de agrupamentos implementada pelo programa STRUCTURE para a avaliação da estrutura genética populacional, nota-se que o maior valor de ΔK convergiu para $K = 2$ (Figura 13), com pequena variação entre os valores estimados para as diferentes replicações, em que K representa o número de grupos genéticos identificados (EVANNO et al., 2005), evidenciando diferenciação genética das populações de *H. speciosa* em dois grupos.

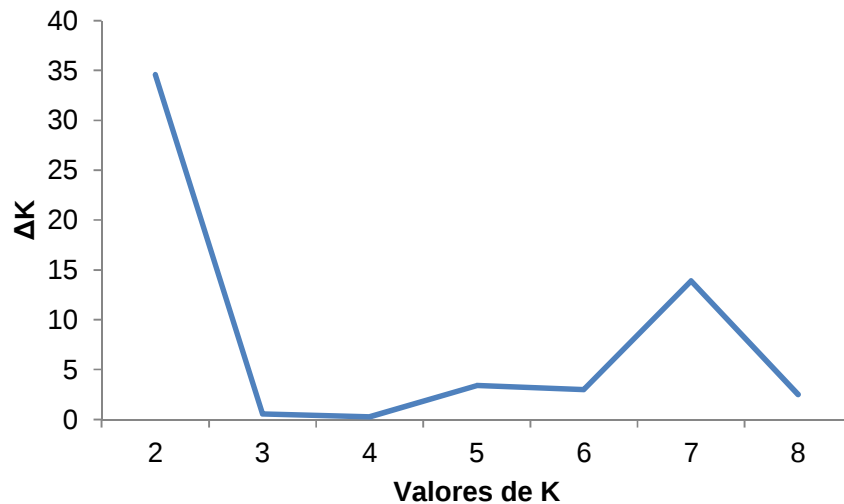


Figura 13 - Correlação entre os valores de K (número de grupos genéticos identificados) e ΔK para as populações de *H. speciosa*.

Analisando o gráfico obtido para a estrutura genética das populações de *H. speciosa* (Figura 14), constatou-se que não foi possível visualizar uma formação de grupos distintos, impossibilitando, portanto, diferenciar claramente os dois grupos de populações, o que é corroborado pelos moderados valores de G_{ST} , F_{ST} e R_{ST} (0,14) estimados para os três estados e pelos resultados da AMOVA que indicam alta diversidade dentro das populações. Todavia, pode-se observar que as populações Jacarecoara e Tapera, naturais do Ceará, apresentaram-se mais homogêneas no que se refere à distribuição de seus indivíduos (maior predominância de barras da cor vermelha) e bem semelhantes entre si, apesar de se terem mostrado divergentes em relação às outras, sobretudo no que diz respeito à população Barra dos Coqueiros, natural de Sergipe, a qual se revelou também como uma das mais homogêneas (predominância de barras verdes em relação às de cor vermelha). As demais populações: Reserva do Caju e Abaís, naturais de Sergipe, e Tamandaré, de Pernambuco, ainda que semelhantes entre si, mostraram-se heterogêneas (ausência de predominância de uma cor), sendo compostas por misturas de barras das cores vermelho e verde.

Portanto, os resultados aqui obtidos para as populações estudadas de *H. speciosa* revelaram que essas apresentam moderada diversidade interpopulacional e que a maior variação estimada foi devida a divergências existentes dentro das populações, possibilitando utilizar essas populações tanto para coleta de germoplasma visando à conservação *ex situ* quanto para conservação *in situ*, bem como em programas de melhoramento genético da espécie.

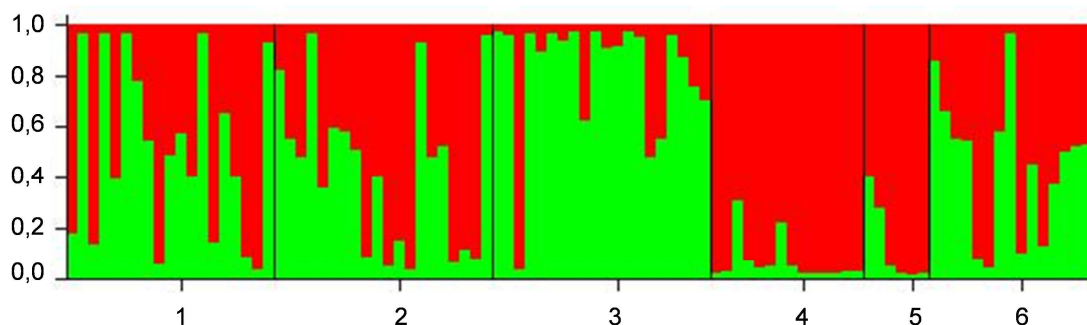


Figura 14 - Estrutura genética das populações de *H. speciosa* em função da análise Bayesiana de agrupamentos implementada pelo programa STRUCTURE para $K = 2$, com amostras ordenadas por população: 1 = Reserva do Caju (Sergipe), 2 = Abaís (Sergipe), 3 = Barra dos Coqueiros (Sergipe), 4 = Jacarecoara (Ceará), 5 = Tapera (Ceará) e 6 = Tamandaré (Pernambuco). Cada grupo é representado por uma cor e cada indivíduo, por uma barra vertical.

Convém salientar que o baixo tamanho populacional decorrente da redução das áreas de ocorrência naturais de *H. speciosa*, aliado ao fato da incidência de alelos privados em todas as populações, tornam-nas complementares quanto à manutenção da diversidade genética da espécie. Fato que evidencia a importância de se conservar a maior quantidade possível de plantas nativas oriundas das seis populações para manutenção da variabilidade *in situ* ou coletar um material genético de um grande número de indivíduos para a conservação *ex situ* em bancos de germoplasma, a fim de que a diversidade genética dessa espécie seja o mais representativa possível.

O presente estudo foi o primeiro a abordar a análise da estrutura genética de populações remanescentes de mangabeira naturais nos Estados do Ceará, Pernambuco e Sergipe, por meio de marcadores microssatélites. Assim, diante da escassez de pesquisa com a espécie *H. speciosa* utilizando-se esse tipo de marcador molecular, faz-se necessário realizar estudos adicionais.

5. CONCLUSÕES

As populações remanescentes de mangabeira (*Hancornia speciosa*) apresentam moderada diversidade genética interpopulacional, sendo a maior variação devida a divergências dentro de populações.

A população Jacareoara é a mais divergente em relação às demais, enquanto os pares de populações Jacareoara x Tapera e Reserva do Caju x Abaís são os mais semelhantes entre si.

Existem alelos privados em todas as populações, tornando-as complementares quanto à manutenção da diversidade genética da espécie.

O alelo 118 ocorre apenas no loco HS27 e apresenta frequências altas, com grande chance de ser fixado; havendo a necessidade de se realizar estudos específicos a fim de verificar a importância deste para a espécie.

As populações apresentam potencial genético para conservação *ex situ* e *in situ* da espécie, bem como para serem utilizadas em programas de melhoramento genético.

É necessário conservar a maior quantidade possível de plantas nativas das seis populações de *H. speciosa* para manutenção da variabilidade *in situ* ou coletar material genético de um grande número de indivíduos das populações para a conservação *ex situ* em bancos de germoplasma, a fim de que a diversidade genética dessa espécie seja a mais representativa possível.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR FILHO, S. P. de; BOSCO, J.; ARAÚJO, I. A. de. **A mangabeira (*Hancornia speciosa*): domesticação e técnicas de cultivo**. João Pessoa: EMEPA, 1998. 26 p. (EMEPA. Documentos, 24).
- ALDRICH, P. R.; HAMRICK, J. L.; CHAVARRIAGE, P.; KOCHERT, G. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 8, p. 933-944, 1998.
- ASSUMPÇÃO, C. F.; BACHIEGA, P.; SANTANA, A. T. M. C.; MORZELLE, M. C.; VILAS BOAS, B. M.; SOUZA, E. C. Néctar misto de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) e cagaita (*Eugenia dysenterica*): perfil sensorial e características físico-químicas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 3, p. 219-224, 2013.
- BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 2, p. 155-165, 2002.
- BECKER, J.; HEUN, M. Barley microsatellites: allele variation and mapping. **Plant Molecular Biology**, v. 27, n. 4, p. 835-845, 1994.
- BERG, E. E.; HAMRICK, J. L. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. **Canadian Journal Forest Research**, v. 27, n. 3, p. 415-424, 1997.
- BICALHO, K. C. **Identidade Genética entre clones de seringueira *Hevea spp.*, de diferentes procedências, baseada em marcadores RAPD**. 2006. 55 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Lavras, Lavras, 2006.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Org.). **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: Editora Jard, 2006. 374 p.
- BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. **Biotechniques**, v. 31, n. 4, p. 793-800, 2001.
- BROOKFIELD, J. F. Y. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. **Molecular Ecology**, v. 5, n.3, 1996. p.453-455.
- BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P. S.; BRONDANI, R. V. Marcadores microssatélites em espécies vegetais. **Biociência**, v. 6, n. 30, p. 46-50, 2003.
- CALLEN, D. F.; THOMPSON, A. D.; SHEN, Y.; PHILLIPS, H. A.; RICHARDS, R. I.; MULLEY, J. C.; SUTHERLAND, G. R. Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellite markers. **American Journal of Human Genetics**, v. 52, n. 5, p. 933-927, 1993.
- CAPINAN, G. C. S. **Seleção de germoplasma de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) definidos por marcadores morfológicos e moleculares**. 2007. 152 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2007.
- CARVALHO, P. C. L. de; SOARES FILHO, W. S.; RITZINGER, R.; CARVALHO, J. A. B. S. Conservação de germoplasma de fruteiras tropicais com a participação do agricultor. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n.1, p. 277-281, 2002.

COSTA, C. F.; COLLEVATTI, R. G.; SOARES, T. N.; CHAVES, L. J.; TELLES, M. P. C. Diversidade e estrutura genética espacial intrapopulacional em indivíduos adultos de *Hancornia speciosa* (Gomes). In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO, 9., 2012, Goiânia. **Anais...** Goiânia: UFG, 2012. p. 10094-10098. Disponível em: <http://eventos.ufg.br/SIEC/portalproec/sites/site5701/site/artigos/10_mestrado/mestrado_miolo-02.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2013.

COSTA, T. S.; SILVA, A. V. C. da; LÉDO, A. da S.; SANTOS, A. R. F. dos; SILVA JUNIOR, J. F. da. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 5, p. 499-508, 2011.

DARRAULT, R. O.; SCHLINDWEIN, C. Polinização de *Hancornia speciosa* (Apocynaceae) In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 1., 2003, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. 1 CD-ROM.

DARRAULT, R. O.; SCHLINDWEIN, C. Polinização. In: SILVA JUNIOR, J. F. da; LÉDO, A. S. (Eds.). **A cultura da mangaba**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. p. 43-56.

DINIZ-FILHO, J. A. F.; COLLEVATTI, R. G.; CHAVES, L. J.; SOARES, T. N.; NABOUT, J. C.; RANGEL, T. F.; MELO, D. B.; LIMA, J. S.; TELLES, M. P. C. Geographic shifts in climatically suitable areas and loss of genetic variability in *Dipteryx alata* ("Baru" Tree; Fabaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 2, p. 1618-1626, 2012.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.

DURAN, C.; EDWARDS, D.; BATLEY, J. Molecular marker discovery and genetic map visualisation. In: EDWARDS, D., HANSON, D.; STAJICH, J. (Eds.). **Applied Bioinformatics**. New York: Springer, 2009. p. 165-189.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. **ARLEQUIN version 3.01**: an integrated software package for population genetics data analysis. Bern: University of Bern, Zoological Institute, 2006. Disponível em: <<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>>. Acesso em: 21 set. 2013.

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

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture**: first draft. Rome: FAO, 2006, 443 p.

FARIAS, G. S. Estrutura genética de populações e filogeografia da acariquara (*Minquartia guianensis* Aubl., Olacaceae). 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

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

FERREIRA, M. E.; MORETZSOHN, M. C.; BUSO, G. S. C. Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 377-420.

FUTUYMA, D. **Biologia evolutiva**. 2. ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 631 p.

GALETTI JUNIOR, P. M.; RODRIGUES, F. P.; SOLÉ-CAVA, A.; MIYAKI, C. Y.; CARVALHO, D.; EIZIRIK, E.; VEASEY, E. A.; SANTOS, F. R.; FARIAS, I. P.; VIANNA, J. A.; OLIVEIRA, L. R.; WEBER, L. I.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FRANCISCO, M. R.; REDONDO, R. A. F.; SICILIANO, S.; DEL LAMA, S. N.; FREITAS, T. R. O.; HRBEK, T.; MOLINA, W. F. Genética da conservação brasileira. In: FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação**. Ribeirão Preto: SBG, 2008. p. 244-274.

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

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. 101-113, 2010.

GIACOMETTI, D. C. Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTEIRAS NATIVAS, 1., 1992, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: EMBRAPA, CNPMF, 1993. p. 13-27.

GILLESPIE, J. H. **Population genetics: a concise guide**. Baltimore: The John Hopkins University Press, 1998. 169 p.

GOUDET, J. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, v. 86, n. 6, p. 485-486, 1995.

GRATTAPAGLIA, D. Aplicações operacionais de marcadores moleculares. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora Ltda., 2007. p. 175-200.

GUEDES, F. B. **Avaliação da diversidade e estrutura genética de *Micoureus paraguayanus* (Didelphidae) em fragmentos de Mata Atlântica**. 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc., 1997. 542 p.

HUBISZ, M. J.; FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 5, p. 1322-1332, 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção agrícola municipal - 2012**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/pam/default.asp?o=27&i=P>>. Acesso em: 13 jul. 2013.

IDURY, R. M.; CARDON, L. R. A simple method for automate allele binning in microsatellite markers. **Genome Research**, v. 7, n. 11, p. 1104-1109, 1997.

JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 10, p. 424-429, 1996.

KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.; RIBAS, L. A.; GANDARA, F. B.; CASTELLEN, M.; PERECIN, M. B.; VENCOVSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, n. 64, p. 93-107, 2003.

KALIA, R. K.; RAI, M. K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, n. 3, p. 309-334, 2011.

KALINOWSKI, S. T. Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. **Conservation Genetics**, v. 5, n. 4, p. 539-543, 2004.

KIMURA, M. Rare variant alleles in the light of the neutral theory. **Molecular Biology and Evolution**, v. 1, n. 1, p. 84-93, 1983.

LEDERMAN, I. E.; SILVA JUNIOR, J. F. da; BEZERRA, J. E. F.; ESPÍNDOLA, A. C. de M. **Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes)**. Jaboticabal: Funep, 2000. 35 p. (Série Frutas Nativas, 2).

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis**: computer program for the analysis of allelic data. Version 1.1. 2002. Disponível em: <<http://www.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php>>. Acesso em: 15 ago. 2013.

LUNA, J. V. U; RAMOS JUNIOR, D. S. Banco de germoplasma de fruteiras nativas. **Bahia Agrícola**, v.7, n.1, p. 25-28, 2005. Disponível em: <http://www3.seagri.ba.gov.br/sites/default/files/comunicacao5_v7n1.pdf>. Acesso em: 11 set. 2013.

MACE, G. M.; SMITH, T. B.; BRUFORD, M. W.; WAYNE, R. K. An overview of the issues. In: SMITH, T. B.; WAYNE, R. K. (Eds.). **Molecular genetic approaches in conservation**. New York: Oxford University Press, 1996. p. 3-12.

MANGARAVITE, E. **Estrutura e diversidade genética no complexo *Cedrela fissilis* (Meliaceae) estimadas com marcadores microssatélites**. 2012. 32 f. Dissertação (Mestrado Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2012.

MATTIETTO, R. A.; SOARES, M. S.; RIBEIRO, C. C. Caracterização física e físico-química de frutos de mangaba provenientes de Belém-PA. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 1., 2003, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. 1 CD-ROM.

MELO, D. B.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; OLIVEIRA, G.; SANTANA, L. L.; SOARES, T. N.; CHAVES, L. J.; NAVES, R. V.; COLLEVATTI, R. G.; TELLES, M. P. C. Optimizing sampling efforts for ex situ conservation of genetic variability of *Dipteryx alata* Vogel. In: IUFRO TREE BIOTECHNOLOGY CONFERENCE 2011, Arraial D'Ajuda. **BMC Proceedings...** Arraial D'Ajuda, 2011. v. 5, suppl. 7, p. 18. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1753-6561-5-S7-P18.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2013.

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

MORAES, M. L. T.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em pequenas populações fragmentadas e em árvores isoladas de *Hymenaea stigonocarpa*. **Scientia Forestalis**, n. 74, p. 75-86, 2007.

MOURA, N. F. **Estrutura genética de subpopulações de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) nos cerrados do Brasil Central**. 2003. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2003.

MOURA, N. F.; CHAVES, L. J.; VENKOVSKY, R.; NAVES, R. V.; AGUIAR, A. V. de; 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.

MOURA, N. F.; CHAVES, L. J.; VENCOVSKY, R.; ZUCCHI, M. I.; PINHEIRO, J. B.; MORAIS, L. K. de; MOURA, M. F. Seleção de marcadores RAPD para o estudo da estrutura genética de populações de *Hancornia speciosa* Gomez. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 119-125, 2005.

MOURA, N. F.; MOURA, M. F.; PEREIRA, M. F.; CHAVES, L. J. Diversidade genética e variação fenotípica de caracteres morfológicos em mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). In: SIMPÓSIO NACIONAL CERRADO, 9., SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE SAVANAS TROPICAIS, 2., 2008, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 1-7. 1 CD-ROM.

NARAIN, N. Mangaba. In: NAGY, S.; SHAW, P. E.; WARDOWSKI, W. F. (Eds.). **Fruits of tropical and subtropical origin: composition, properties and uses**. Lake Alfred: Florida Science Source, 1990. p. 159-165.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

NEWTON, A. C.; ALLNUTT, T. R.; GILLIES, A. C. M.; LOWE, A. J.; ENNOS, R. A. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 14, n. 4, p. 140-146, 1999.

OLIVEIRA, M. do S. P. de; SANTOS, J. B. dos; AMORIM, E. P.; FERREIRA, D. F. Variabilidade genética entre acessos de açaizeiro utilizando marcadores microssatélites. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 5, p. 1253-1260, 2010.

PEREIRA, A. V.; PEREIRA, E. B. C.; SILVA JUNIOR, J. F. da.; SILVA, D. B. da. In: VIEIRA, R. F.; COSTA, T. da S.; SILVA, A. D. B. da.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. (Eds.). **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. p. 188-213. Disponível em: <http://www.agabrasil.org.br/_Dinamicos/livro_frutas_nativas_Embrapa.pdf>. Acesso em: 12 set. 2012.

PINTO, C. E.; OLIVEIRA, R.; SCHLINDWEIN, C. Do consecutive flower visits within a crown diminish fruit set in mass-flowering *Hancornia speciosa* (Apocynaceae)? **Plant Biology**, v. 10, n. 3, p. 408-412, 2008.

PINTO, J. F. N. **Variabilidade genética de guariroba (*Syagrus oleracea* Becc.) determinadas por descritores morfológicos e marcadores RAPD**. 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2009.

PRASANTH, V. P.; CHANDRA, S.; JAYASHREE, B.; HOISINGTON, D. **AlleloBin**: a program for allele binning of microsatellite markers based on the algorithm of Idury and Cardon (1997). Patancheru: ICRISAT, 2006. Disponível em: <<http://www.icrisat.org/bt-software-d-allelobin.htm>>. Acesso em: 15 ago. 2013.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

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

RAMOS, S. R. R.; QUEIROZ, M. A. de; ROMÃO, R. L.; SILVA JUNIOR, J. F. da. Germoplasma vegetal conservado no Nordeste brasileiro: situação atual, prioridades e perspectivas. **Magistra**, v. 20, n. 3, p. 205-217, 2008.

RIBEIRO, S. S.; JESUS, A. M. de; ANJOS, C. S. dos; SILVA, T. B. da; SANTOS, A. D. C.; JESUS, J. R. de; ANDRADE, M. S.; SAMPAIO, T. S.; GOMES, W. F.; ALVES, P. B.; CARVALHO, A. A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. de; PINHEIRO, M. L. B.; PRATA, A. P. N.; BLANK, A. F.; SILVA-MANN, R.; MORAES, V. R. S.; COSTA, E. V.; NOGUEIRA, P. C. L.; BEZERRA, D. P. Evaluation of the cytotoxic activity of some brazilian medicinal plants. **Planta Medica**, v. 78, n. 14, p. 1601-1606, 2012.

RODRIGUES, A. J. L. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites e estrutura genética de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae)**. 2009. 106 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

RODRIGUES, N. B. **Variabilidade genética de populações de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne e *Dipteryx alata* Vogel em áreas nativas e em plantios de recuperação de áreas degradadas em Paracatu, MG**. 2013. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais). Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2013.

ROJAS GANZALEZ, S.; YUYAMA, K.; CLEMENT, C. R.; NAGAO, E. O. Diversidade genética em acessos do banco de germoplasma de camu-camu (*Myrciaria dubia* [H.B.K.] McVaugh) do INPA usando marcadores microssatélites (EST-SSR). **Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 12, n. 1, p. 51-64, 2011.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOEFFEL, S.; SHCARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICHI, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.

SANTOS, A. R. F. dos; SILVA, A. V. C. da; GOES, I. B.; SOUZA, E. M. de; MUNIZ, E. N.; NARAIN, N. Situação atual e perspectivas para o cultivo da mangaba no Estado de Sergipe. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE SISTEMAS DE PRODUÇÃO, 7., 2007, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Sistemas de Produção, 2007. 1 CD-ROM.

SANTOS, G. G.; SILVA, M. R. Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomez) ice cream prepared with fat replacers and sugar substitutes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 3, p. 621-628, 2012.

SANTOS, K. L. dos; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O. Caracterização genética de populações naturais de goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*) com marcadores microssatélites heterólogos. **Biotemas**, v. 24, n. 4, p. 75-83, 2011.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; SIQUEIRA, A. C. M. de F.; ZANATTO, A. C. S. Sistema de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* Mart. O. Ktze.: implicações para a conservação e o melhoramento genético. **Scientia Forestalis**, n. 58, p. 25-40, 2000.

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

SILVA, A. V. C. da; SANTOS, A. R. F. dos; WICKERT, E.; SILVA JUNIOR, J. F. da; COSTA, T. S. Divergência genética entre acessos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6, n. 4, p. 572-578, 2011.

SILVA, A. V. C. da; RABBANI, A. R. C.; SENA-FILHO, J. G. de; ALMEIDA, C. S.; FEITOSA, R. B. Genetic diversity analysis of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), an exotic brazilian tropical species. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 15, n. 2, p. 217-225, 2012.

SILVA JUNIOR, J. F. da; BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E. Recursos genéticos e melhoramento de fruteiras nativas e exóticas em Pernambuco. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Eds.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 25 p. Disponível em: <<http://www.cpatia.embrapa.br/catalogo/livroorg/index.html>>. Acesso em: 6 set. 2013.

SILVA JUNIOR, J. F. da; LÉDO, A. da S. Botânica. In: SILVA JUNIOR, J. F. da; LÉDO, A. da S. (Eds.). **A cultura da mangaba**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. p. 25-33.

SILVA JUNIOR, J. F. da; XAVIER, F. R. S.; LÉDO, C. A. da S.; NEVES JUNIOR, J. S.; MOTA, D. M. da; SCHMITZ, H.; MUSSER, R. dos S.; LÉDO, A. da S. Variabilidade em populações naturais de mangabeira do litoral de Pernambuco. **Magistra**, v. 19, n. 4, p. 373-378, 2007.

SILVA JUNIOR, J. F. da; LÉDO, A. da S.; MUNIZ, A. V. C. da S.; RAMOS, S. R. R. Recursos genéticos de fruteiras nativas e adaptadas do Nordeste: situação do germoplasma conservado ex sito na região. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2012, Belém. **Anais...** Belém: SBRG, 2012. 4 p. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/75202/1/981.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2013.

SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v. 236, n. 4803, p. 787-792, 1987.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v. 139, n. 1, p. 457-462, 1995.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; CRAVO, N. R.; OLIVEIRA, L. M. de; SILVA, D. R. G.; PAIVA, P. D. de O. Cultura da mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). **Boletim Agropecuário**, n. 67, p. 1-12, 2006.

SOLLER, M.; BECKMANN, J. S. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 67, n. 1, p. 25-33, 1983.

SOUZA, I. P. de; ARAUJO, R. B.; RODRIGUES, A. J. L. Estudo da estrutura genética de populações naturais de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae), a partir de diferentes parâmetros biométricos. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 7.; JORNADA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO DA UEG, 6., 2010, Anápolis. **Anais...** Goiânia: UEG, 2010. 14 p.

SOUZA, L. M. F. I. de; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBEN, A. M. Estrutura genética em populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* St. Hil. **Scientias Forestalis**, n. 65, p. 70-79, 2004.

STEARNS, S. C. **The evolution of life histories**. Oxford: University Press, 1992. 249 p.

TANKSLEY, S. D.; YOUNG, N. D.; PATERSON, A. H.; BONIERBALE, M. W. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Nature Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 257-264, 1989.

TARAZI, R.; MORENO, M. A.; GANDARA, F. B.; FERRAZ, E. M.; MORAES, M. L. T.; VINSON, C. C.; CIAMPI, A. Y.; VENCOSKY, R.; KAGEYAMA, P. Y. High levels of genetic differentiation and selfing in the Brazilian cerrado fruit tree *Dipteryx alata* Vog. (Fabaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p.78-85, 2010.

THENDRAL HEPSIBHA, B.; PREMALARSHMI, V.; SEKAR, T. Genetic diversity in *Azima tetracantha* (Lam) assessed through RAPD analysis. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 2, p. 170-173, 2010.

TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, v. 10, n. 7, p. 967-981, 2000.

TRIPATHI, Y. K.; GURHA, P.; GHOSH, D.; KUMAR, R. V.; GOSWAMI, H. K.; PRAKASH, V. Determination of phylogenetic relationship among isoetes species using random primers. **Turkish Journal of Botany**, v. 31, n. 5, p. 367-372, 2007.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. F. **Micro-checker user guide**. Hull: The University of Hull, 2003. 28 p.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. F. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535-538, 2004.

VIEIRA NETO, R. D. **Cultura da mangabeira**. Aracaju: EMBRAPA, CPATC, 1994. 16 p. (Circular Técnica, 2).

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRITERS, A.; POT, J.; PALEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WANG, W.; CHEN, L.; YANG, P.; HOU, L.; HE, C.; GU, Z.; LIU, Z. Assessing genetic diversity of populations of top mouth culter (*Culter burnus*) in China using AFLP markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 10, p. 662-669, 2007.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data**. Sunderland: North Carolina State University, Sinauer Associates Inc. Pub., 1996. 445 p.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, 1984.

WEIR, B. S.; HILL, W. G. Estimating F-statistics. **Annual Review of Genetics**, v. 36, p. 721-750, 2002.

WHITE, G. M.; BOSHIER, D. H.; POWELL, W. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology**, v. 8, n. 11, p. 1899-1909, 1999.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations: the theory of gene frequencies**. Chicago: University of Chicago Press, 1969. v. 2. 511 p.

WHITLOCK, M. C.; MCCAULEY, D. E. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \neq 1/(4Nm + 1)$. **Heredity**, v. 82, n. 2, p.117-125, 1999.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J. DNA polymorphism amplified by arbitrary are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

YOUNG, C. E. F. Economia do extrativismo em áreas de Mata Atlântica. In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. (Orgs.). **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos naturais**. 2. ed. São Paulo: Senac, 2003. p. 183-189.

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

7. ANEXOS

Anexo A - Tamanho amostral (n), número de alelos (A), riqueza alélica (R), alelos privados (Ap), heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho) e coeficiente de endogamia (f) em relação aos nove locos avaliados para as seis populações de *H. speciosa*.

População	Loco	n	A	R	Ap	He	Ho	f
Reserva do Caju	HS01	14	5	3,72	1	0,63	0,21	0,67
	HS05	19	9	5,69	1	0,85	0,47	0,45
	HS06	19	6	3,63	1	0,65	0,53	0,19
	HS08	18	4	2,90	0	0,57	0,67	-0,17
	HS10	19	3	2,40	0	0,42	0,32	0,26
	HS11	19	6	3,63	1	0,65	0,53	0,19
	HS16	19	6	3,62	0	0,63	0,53	0,17
	HS27	18	2	1,64	1	0,16	0,17	-0,06
	HS33	19	5	3,52	0	0,64	0,42	0,35
	Total		46		5			
	Média	18,22	5,11	3,42		0,58	0,43	0,26
	IC ¹							0,11 a 0,42*
Abaís	HS01	19	7	3,92	0	0,59	0,26	0,56
	HS05	15	6	3,59	0	0,51	0,47	0,08
	HS06	20	6	3,38	0	0,65	0,60	0,08
	HS08	20	6	3,62	1	0,56	0,60	-0,08
	HS10	20	5	3,37	1	0,62	0,50	0,20
	HS11	20	6	3,38	0	0,65	0,60	0,08
	HS16	20	6	3,38	0	0,65	0,60	0,08
	HS27	20	2	1,78	0	0,22	0,25	-0,12
	HS33	20	6	3,38	0	0,65	0,60	0,08
	Total		50		2			
	Média	19,33	5,56	3,31		0,57	0,50	0,12
	IC							0,03 a 0,25*

Anexo A - (Continuação).

População	Loco	n	A	R	Ap	He	Ho	f
Barra dos Coqueiros	HS01	14	4	3,14	0	0,55	0,00	1,00
	HS05	20	9	5,45	1	0,82	0,50	0,39
	HS06	19	5	2,95	1	0,41	0,37	0,11
	HS08	20	5	3,46	0	0,71	0,60	0,16
	HS10	20	2	2,00	0	0,50	0,55	-0,10
	HS11	19	5	2,95	1	0,41	0,37	0,11
	HS16	19	6	2,91	2	0,38	0,21	0,45
	HS27	20	2	1,99	0	0,43	0,40	0,07
	HS33	20	3	2,03	0	0,23	0,15	0,36
	Total		41		5			
	Média	19,00	4,56	2,99		0,49	0,35	0,30
	IC							0,10 a 0,53*
Jacarecoara	HS01	14	7	4,82	1	0,77	0,57	0,27
	HS05	5	4	4,00	0	0,73	0,20	0,75
	HS06	14	5	4,28	0	0,78	0,71	0,09
	HS08	14	6	3,80	2	0,66	0,64	0,03
	HS10	14	4	3,67	0	0,71	0,71	-0,01
	HS11	14	5	4,28	0	0,78	0,71	0,09
	HS16	12	5	4,30	0	0,79	0,75	0,05
	HS27	14	4	2,69	1	0,49	0,43	0,13
	HS33	14	5	4,42	0	0,80	0,71	0,11
	Total		45		4			
	Média	12,78	5,00	4,03		0,72	0,61	0,16
	IC							0,06 a 0,34*
Tapera	HS01	6	3	2,67	0	0,32	0,33	-0,05
	HS05	5	3	3,00	0	0,62	0,00	1,00
	HS06	6	6	5,62	0	0,86	0,67	0,25
	HS08	6	4	3,67	1	0,68	0,33	0,54
	HS10	6	5	4,64	0	0,74	0,67	0,11
	HS11	6	6	5,62	0	0,86	0,67	0,25
	HS16	6	5	4,80	0	0,83	0,33	0,62
	HS27	6	2	1,99	0	0,30	0,33	-0,11
	HS33	5	5	5,00	0	0,82	0,40	0,54
	Total		39		1			
	Média	5,78	4,33	4,11		0,67	0,41	0,40
	IC							0,22 a 0,60*

Anexo A - (Continuação).

População	Loco	n	A	R	Ap	He	Ho	f
Tamandaré	HS01	12	2	1,91	0	0,29	0,00	1,00
	HS05	15	9	5,72	1	0,84	0,67	0,21
	HS06	15	3	2,82	0	0,63	0,67	-0,07
	HS08	14	5	4,19	0	0,78	0,71	0,09
	HS10	14	2	2,00	0	0,52	0,50	0,03
	HS11	15	3	2,82	0	0,63	0,67	-0,07
	HS16	10	3	2,50	0	0,57	0,60	-0,05
	HS27	15	2	1,56	0	0,13	0,00	1,00
	HS33	15	3	2,82	0	0,63	0,60	0,04
	Total		32		1			
	Média	13,89	3,56	2,93		0,56	0,49	0,12
IC								0,01 a 0,31*

¹ IC = Intervalo de Confiança; * = significativo a 95% de probabilidade, com base em 10.000 reamostragens *bootstrap*.