



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
Pró Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais do Cerrado

Cássia Aparecida Nogueira

**Cienciometria e análise da variabilidade genética de variedades de
*Hancornia speciosa***

**Anápolis
2015**

Cássia Aparecida Nogueira

Cienciometria e análise da variabilidade genética de variedades de *Hancornia speciosa*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais do Cerrado da Universidade Estadual de Goiás para a obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais do Cerrado.

Orientadora: Prof^a Dr^a Luciane Madureira de Almeida

Anápolis
2015

Nogueira, Cássia Aparecida.

Cienciometria e análise da variabilidade genética de variedades de *Hancornia speciosa* / Cássia Aparecida Nogueira.

72 f. il.

Orientador: Prof. Dr. Luciane Madureira de Almeida

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Goiás. Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas. Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Cerrado, 2015.

Bibliografia.

1. Cerrado. 2. Frutífera nativa 3. Mangabeira. 4. Marcadores moleculares 5. Variabilidade genética. I. Título.

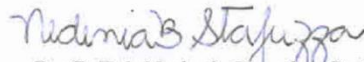
CÁSSIA APARECIDA NOGUEIRA

CIENCIOMETRIA E ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE
VARIEDADES DE *HANCORNIA SPECIOSA*

Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos
Naturais do Cerrado da Universidade Estadual de Goiás,
para a obtenção do grau de Mestre, aprovada em 23 de fevereiro de 2015, pela
Banca Examinadora constituída pelas seguintes professoras:



Prof.^a. Dr.^a. Luciane Madureira de Almeida
Presidente da Banca
Universidade Estadual de Goiás



Prof.^a. Dr.^a. Nedenia Bonvino Stafuzza
Membro externo
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"



Prof.^a. Dr.^a. Samantha Salomão Caramori
Membro interno
Universidade Estadual de Goiás

Ao meu Amor e companheiro Patrício Filho, alicerce da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida e por ter me dado a capacidade para concretizar mais essa etapa da minha caminhada.

Aos meus pais, João e Odete, minha irmã Zilda e toda minha família, seres extraordinários que sempre me apoiaram nas minhas escolhas, mesmo longe se fizeram presentes, dando força, tanta paciência e compreendendo esse período de ausência de minha parte.

Ao meu marido Patrício Filho pelo amor, incentivo, paciência e constante força, e aos meus sogros Cleuza e Patrício pelo carinho acreditando nos meus sonhos.

A Prof.^a Dr.^a Luciane Madureira de Almeida pela orientação, amizade, ensinamentos, paciência e dedicação, que me conduziram a conclusão desta importante etapa da minha formação, a qual levarei como exemplo por toda vida.

A Prof.^a Dr.^a Nedenia Bonvino Stafuzza pela convivência, amizade e valiosas contribuições na realização deste projeto.

Ao Prof. Ivandilson Pessoa Pinto Menezes pelo apoio nas análises estatísticas dos dados.

Ao Fernando pós-doutorando da UFG pelo auxílio na realização dos experimentos citogenéticos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Cerrado (RENAC) essenciais a minha formação, por serem doadores de conhecimento e experiências.

Aos meus novos amigos Thuanne, Tiago, Bruna, Patrícia e Nina que contribuíram, apoiaram e deram forças para a conclusão deste projeto.

A todos meus colegas do mestrado, pela convivência às vezes sofrida, mas sempre divertida durante este período. Em especial a Érica, Elaine, Rodrigo e Pedro que estiveram sempre ao meu lado, dando apoio, ajudando nas dificuldades e nos momentos de alegrias.

À Universidade Estadual de Goiás (UEG) pela bolsa de estudo concedida durante a realização do mestrado.

À CAPES e FAPEG pelo auxílio pesquisa AUXPE CAPES/FAPEG 2036/2013.

A todos aqueles que contribuíram de direta ou indiretamente para a realização e concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo	08
Abstract	09
Introdução	10
Objetivos	22
Material e Métodos.....	23
Resultados	29
Discussão	42
Conclusão	47
Referências Bibliográficas	48
Anexo	57

RESUMO

Hancornia speciosa, popularmente conhecida como "Mangabeira", é uma frutadeira nativa do Cerrado Brasileiro que tem grande potencial econômico devido aos seus usos múltiplos. O principal interesse comercial da espécie é a produção de frutos, que são consumidos *in natura* ou processados para a fabricação de doces, geleias, sorvetes, sucos e licores entre outras iguarias. Como a utilização é baseada principalmente na atividade extrativista, existem trabalhos que sugerem o alto risco de extinção para a espécie. Existem seis variedades botânicas de mangabeira, que são elas: *speciosa*, *maximilliani*, *lundii*, *cuyabensis*, *gardneri* e *pubescens*, as quais diferem morfológicamente principalmente pela folha e flor. Apesar do potencial econômico da espécie, existem poucos estudos sobre a variação morfológica, diversidade genética e farmacológica da mangabeira. O levantamento dos estudos realizados com a *H. speciosa*, juntamente com o conhecimento de como a variabilidade genética dessa espécie é organizado entre as populações é útil para programas de conservação e melhoramento genético. Neste estudo foi realizado um levantamento ciencimétrico sobre a mangabeira com o objetivo de mostrar a importância da espécie *H. speciosa*, fomentar e direcionar futuras pesquisas sobre a planta. Como resultado, verificou-se um baixo índice de estudos sobre a espécie, sendo encontrados apenas 139 artigos publicados nos últimos 68 anos. Em relação às áreas de abrangência dos estudos, percebeu-se que existem poucos trabalhos sobre a caracterização morfológica, molecular e farmacológica das diferentes variedades botânicas da espécie, sendo que esses pontos devem ser mais bem explorados em pesquisas futuras. Em relação às análises de variabilidade genética, duas ferramentas foram utilizadas, os marcadores moleculares e a citogenética. Os dados com marcadores moleculares foram gerados a partir do uso de marcadores microssatélite (EST-SSR) e marcadores randômicos (RAPD). Os resultados obtidos com marcadores EST-SSR mostraram uma alta taxa de transferibilidade entre *C. roseus* para *H. speciosa* (75%), baixa heterozigosidade (H_e) e variabilidade loco (2 ou 3 alelos por loco). Esses resultados sugerem uma baixa diversidade genética nas amostras de mangabeira. Em relação à distribuição espacial, o índice de dissimilaridade de Jaccard e distâncias geográficas indicaram que não houve uma estruturação espacial da variabilidade genética. Em relação à taxonomia, os marcadores obtidos não são capazes de distinguir quaisquer variedades botânicas *H. speciosa*. Os dados gerados poderão ser utilizados no estabelecimento de estratégias de conservação, bem como no direcionamento de cruzamentos em programas de melhoramento, ampliando o conhecimento sobre uma espécie que possui potencial econômico associado à produção de frutos e de fitoterápicos.

Palavras-chave: Cerrado, frutífera nativa, mangabeira, marcadores moleculares, variabilidade genética.

ABSTRACT

Hancornia speciosa, popularly known as “mangabeira”, is a native fruit tree of the Brazilian Cerrado that has great economic potential due to its multiple uses. The main commercial interest of this species is the fruit production. The fruit can be eaten or processed for the manufacture of jams, jellies, ice-cream, juices and liquors among other delicacies. This species has a high risk of extinction As the use of the species is based mainly on extractive activity. *H. speciosa* presents six botanical varieties that they are: *speciosa*, *maximilliani*, *lundii*, *cuyabensis*, *gardneri* e *pubescens*, which morphologically mainly differ by leaf and flower. Despite the species economic potentials, there are few studies on the morphological variation, genetic and pharmacological diversity of mangabeira. Scientometric studies about *H. speciosa* can be useful for conservation and breeding projects of this species, since they can identify deficiencies and helping to direct futures researches. As a result, there was a low level of studies of the species, being found only 138 articles published in the last 68 years. In relation to the areas covered by the study, it was noted that there are few studies on the morphological, molecular and pharmacological of different botanical varieties of the species, and these points should be more widely used in future research. This research identify that there are few studies about morphological, molecular and pharmacological characterization of *H. speciosa* botanical varieties. In relation to genetic variability analysis, two tools were used, molecular markers and cytogenetics. The data with molecular markers were generated from the use of microsatellite markers (EST-SSR) and random markers (RAPD). The results obtained with SSR markers showed a high rate of transferability between *C. roseus* *H. speciosa* (75%), low heterozygosity (*He*) and variability locus (2 or 3 alleles per locus). These results suggest low genetic diversity mangabeira samples. Regarding the spatial distribution, the dissimilarity index of Jaccard and geographical distances, showed no spatial structure of genetic variability. In relation to the taxonomy, the used markers are not able to distinguish any botanical varieties *H. speciosa*. The information generated can be used in establishing conservation strategies, as well as in the direction of crosses in improvement programs, expanding the knowledge of a species that has economic potential associated with the production of fruit and herbal medicines.

Keywords: Cerrado, genetic variability, mangabeira, molecular markers, native fruit.

INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma do país e está localizado predominantemente no Planalto Central Brasileiro, cobrindo uma área de aproximadamente 2.039.386 de km², o que equivale a 25% do território nacional (MMA, 2010). Este bioma possui uma grande heterogeneidade de espécies animais e vegetais, as quais representam cerca de 5% da biodiversidade mundial (RIGONATO e ALMEIDA, 2003). No Cerrado também é encontrada alta abundância de espécies endêmicas, e é considerada a savana mais rica do mundo, contando com vários ecossistemas e uma flora com mais de 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas (MMA, 2015).

A grande riqueza natural do Cerrado tem despertado nas últimas décadas um aumento no interesse em explorar espécies nativas (BARROS, 2008). As frutíferas são um dos exemplos de espécies nativas exploradas comercialmente no Cerrado. Elas podem ser utilizadas com finalidade alimentícia, medicinal, ornamental, produtora de madeira, fibra, óleo, material para artesanato e outros (BORGES e FELFILI, 2003). Contudo, a utilização dessas espécies é realizada muitas vezes de forma extrativista, o que pode levar a uma erosão genética ou até mesmo a extinção da espécie.

Assim, torna-se necessário elevar o número de estudos de caracterização, conservação e utilização das espécies do Cerrado, além da difusão de uso sustentável dessas espécies pelas populações locais, de forma que se diminua o consumo extrativista e passe a estabelecer culturas dessas espécies nativas (BRACK et al., 2007). Nas últimas décadas está ocorrendo um crescente desmatamento, queimadas e avanço agrícola, modificando o Cerrado ao longo dos anos, restando apenas 50,84% de vegetação remanescente, contribuindo para a perda da biodiversidade deste bioma (IBAMA, 2010).

Das frutíferas com potencial de utilização agrícola no Cerrado destacam-se as que produzem frutos comestíveis de formas, tamanhos, cores e sabores característicos e variados, tornando uma alternativa econômica para o aproveitamento sustentável da região. Dentre as espécies que já são utilizadas como fonte de renda podem ser citadas: *Eugenia dysenterica* (cagaita), *Butiá capitata* (coquinho-azedo ou butiá), *Hancornia speciosa* (mangabeira), *Passiflora sp* (maracujá nativo), *Annona crassiflora* (araticum ou marolo) e *Caryocar brasiliense* (pequi), que são consumidas *in natura* ou processadas para a fabricação de doces, geleias, sucos e licores entre outras iguarias, além de servirem de alimento para a fauna (CARVALHO, 2007).

Além de serem utilizadas como alimentos e para o comércio, algumas frutíferas do

Cerrado também possuem propriedades medicinais de grande importância e são utilizadas pelas comunidades locais, por fazerem parte de suas tradições e costumes (BARROS, 2008). Dados da literatura apontam no Cerrado Goiano 326 espécies de plantas com uso medicinal e estas espécies estão distribuídas em 79 famílias. As famílias que apresentaram maior número por espécies são: 40 na família das Fabaceae, 29 nas Asteraceae, 18 nas Lamiaceae, 11 nas Apocynaceae, 11 nas Myrtaceae, 11 nas Bignoniaceae e 8 nas Rutaceae (MESQUITA-NETO e SOUZA, 2009).

O uso de uma planta na medicina popular é um bom indicativo dos potenciais de compostos naturais para a descoberta de novas substâncias terapêuticas. Dessa forma o conhecimento popular é um grande aliado do meio científico, indicando quais espécies de plantas são fortes candidatas para estudos empíricos. São exemplos de frutíferas nativas do Cerrado usadas na medicina popular e estudadas cientificamente: a *Anacardium occidentale* L. popularmente conhecida como cajueiro, o qual possui potencial anti-hiperglicêmico, antioxidante e protetor renal (DE BRITO et al., 2007; FENNER et al., 2006; PEREIRA et al., 2006); a *Annona muricata* L. conhecida como graviola, a qual possui efeito larvicida, antitumoral, antioxidante (BASKAR et al., 2007, MÉNAN et al., 2006; OSORIO et al., 2007); *Caryocar brasiliense* conhecida como pequi, a qual possui propriedades antioxidantes (MIRANDA-VILELA, 2009); e a *H. speciosa* conhecida como mangabeira, por possuir potencial antioxidante, anti-inflamatório e angiogênico (ALMEIDA et al., 2014; MARINHO et al., 2011; SANTOS et al., 2007). O potencial econômico dessas espécies tanto na produção de frutos como de novos fármacos mostrou a necessidade de caracterização biológica, conservação e melhoramento genético das espécies presentes no Cerrado. Dentre as diversas frutíferas do Cerrado com potencial medicinal, optou-se nesse trabalho em estudar a mangabeira.

A *H. speciosa*, popularmente conhecida como mangabeira, é uma fruteira nativa de várias regiões e ecossistemas do Brasil (LEDERMAN e BEZERRA, 2003), a qual vegeta espontaneamente em solos secos e arenosos adaptando-se a diferentes climas (MOURA et al., 2002). No Cerrado, a mangabeira ocorre principalmente em encostas, as quais geralmente são inapropriadas para agricultura (REZENDE et al., 2003). A planta é perenifólia, frutífera, possui copa irregular, tronco tortuoso, bastante áspero e ramificado. Os ramos são lisos e avermelhados e a raiz é pivotante profunda, circundada de raízes secundárias bem desenvolvidas. Possui folhas simples, opostas, ovais ou lanceoladas, pecioladas e de consistência coriácea (LEDERMAN et al., 2000). Apresenta inflorescência no ápice dos

ramos, com duas a cinco flores hermafroditas de coloração branca, de três a quatro centímetros de comprimento. As sementes da mangabeira são discóides, achatadas, com sete a oito milímetros de diâmetro, de cor castanho-clara, rugosas com hilo central. As sementes são consideradas recalcitrantes, isto é, não suportam ressecamento, perdendo rapidamente o poder germinativo assim que são retiradas do fruto (VIEIRA NETO et al., 2009).



Figura 1: Imagens da *H. speciosa*. 1.) árvore; 2.) folhas; 3.) inflorescência e 4.) fruto.

Em relação a sua classificação botânica, o gênero *Hancornia* é considerado monotípico e, por isso, sua única espécie é *H. speciosa* Gomes, que pertence à classe Dicotyledoneae, ordem Gentianales, família Apocynaceae, gênero *Hancornia* e à espécie *H. speciosa* com seis variedades: *H. speciosa* variedade *speciosa*, *maximilliani*, *lundii*, *cuyabensis*, *gardnerie* e *pubescens* (MONACHINO, 1945). As variedades botânicas se diferenciam por algumas características morfológicas, principalmente da folha e da flor, existindo uma grande dificuldade em identificar diferentes variedades e muitas vezes dúvidas no sistema de classificação e identificação, o que pode induzir a erros (MOURA, 2003). A seguir serão apresentadas as principais características morfológicas e localização de cada linhagem de mangabeira, segundo Monachino (1945):

- *H. speciosa* Gomes (variedade típica) ou *H. speciosa* variedade *speciosa*: possui folhas glabras, com pecíolo de 0,9 cm a 0,15 cm de comprimento e limbo foliar com até 6 cm de comprimento e 2 cm de largura, e está presente na região nordeste do país, na divisa com a Bahia, o Piauí e o Maranhão;

- *H. speciosa* variedade *cuyabensis*: apresenta o pecíolo com cerca de 0,3 a 0,5 cm de comprimento, limbo de 4,0 a 10 cm de comprimento e 1,5 a 3,0 cm de largura, , cálice glabro externamente, corola grande, glabra externamente. Está presente principalmente no estado do Mato Grosso;

- *H. speciosa* variedade *maximiliani*: apresenta pecíolo com cerca de 0,8 cm de comprimento, limbo de 0,5 a 6,0 cm de comprimento e 2,0 a 2,5 cm de largura, um pouco menor e o pecíolo um pouco mais curto que a variedade típica. Sua distribuição geográfica está associada ao estado de Minas Gerais;

- *H. speciosa* variedade *lundii*: possui pecíolo com 0,3 a 0,5 cm de comprimento, limbo de 5,0 a 7,0 cm de comprimento e 3,0 cm de largura, cálice cerdoso-pubescente na parte inferior da nervura central, pedicelos pubescentes. Assim como a variedade *maximiliani*, sua distribuição geográfica está associada principalmente ao estado de Minas Gerais;

- *H. speciosa* variedade *gardneri*: possui pecíolos de 0,3 a 0,5 cm de comprimento e limbo foliar de 6 a 12 cm de comprimento e 3 a 6 cm de largura, folhas glabras, frutos maiores e de coloração verde predominante, presente em todo estado de Goiás;

- *H. speciosa* variedade *pubescens*: apresenta pecíolos curtos, limbo pubescente na parte inferior, com 6,0 a 12 cm de comprimento e 3,0 a 6,0 cm de largura, ramos densamente pubescentes, corola maior com lóbulos cerdosos pubescentes, tubo pubescentes externamente. É encontrada principalmente nos estados de Goiás e Minas Gerais.

De forma geral a distribuição geográfica da mangabeira no Brasil pode ser observada na

Figura 2 (Embrapa, 2009). Essa distribuição estende-se pela Costa Atlântica desde o Amapá e o Pará, nos tabuleiros costeiros e nas baixadas litorâneas do Nordeste, até o Espírito Santo, por toda a região de Cerrado do Brasil Central até o Pantanal (LEDERMAN et al., 2000).



Figura 2: Mapa das regiões de ocorrência da mangabeira no território brasileiro (EMBRAPA, 2009).

O interesse na cultura da mangabeira vem crescendo nos últimos anos, sendo o principal interesse comercial o fruto, o qual é denominado mangaba. O mesmo pode ser consumido *in natura* ou processado como geleia, doce, sorvete, suco, refresco, picolé, licor, vinho e xarope (SOUZA, 2001). Além dos frutos, outros importantes subprodutos com potencial farmacológico podem ser extraídos dessa planta.

Por exemplo, estudos mostraram que as folhas de *H. speciosa* possuem compostos bioativos que controlam eficientemente a pressão arterial (SILVA et al., 2011a). Neste estudo a fração do extrato etanólico das folhas de *H. speciosa* (SFH) foi administrado para camundongos por via oral e seu desempenho foi comparado ao do Captopril, medicamento comumente usado para controle de pressão arterial. Os resultados demonstraram que o SFH e o captopril induziram um efeito hipotensivo em camundongos controlando a pressão arterial sistólica através da inibição da atividade da enzima conversora da angiotensina em soro. Contudo, o SFH foi administrado em uma dosagem 10 vezes menor do que o captopril, o qual é considerado um dos melhores medicamentos utilizados para controle de pressão arterial atualmente (padrão ouro da ANVISA).

Já a casca de *H. speciosa* produz diferentes tipos de flavonóides, catequinas, antocianinas e taninos, que podem ser utilizados no tratamento de gastrite causada por *Helicobacter pylori* (MORAES et al., 2008). Neste estudo, os autores extraíram dois extratos diferentes da casca de *H. speciosa*, um deles usou a casca seca misturada com etanol (HE) e o outro diluída em água (BI). Os resultados mostraram que a HE aumentou o pH e diminuiu da produção de ácido de suco gástrico promovendo um aumento da quantidade de muco e efeito anti-*H. pylori*, enquanto que o BI apenas estimulou a síntese de muco.

O látex de *H. speciosa* é utilizado tanto na medicina popular como também existem recentes estudos científicos que mostram suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidante e angiogênica. Na medicina popular o látex é usado no tratamento de doenças fúngicas, tuberculose, disfunções hepáticas, úlceras, dermatose, verrugas, câimbras, pancadas e infecções (GUARIM NETO, 1997; PINHEIRO et al., 2001; SILVA JUNIOR, 2003). Cientificamente, Marinho et al. (2011) mostraram que o látex de mangabeira apresenta atividade anti-inflamatória, a qual foi constatada a inibição da formação de ácido nítrico, prostaglandina E2 e produção de citocinina. Esse estudo foi realizado com ratos e a metodologia foi a análise de analgesia e modelo de inflamação. Como resultado foi observado que o látex aumentou os níveis de mediadores inflamatórios e inibiu significativamente: 1.) o número de contorções; 2.) o tempo que o animal passou lambendo a pata infectada com formalina; 3.) o edema da pata dos ratos; 4.) a inflamação induzida por injeção subcutânea de carragenina; 5.) a

migração de células; 6.) o volume de exsudado; e 7.) as proteínas extravasamento.

Em outro estudo Sampaio (2008) mostrou que o látex extraído do fruto verde de mangabeira tem o efeito antioxidante, o qual gerou efeito hepatoprotetor significativo nos ratos testados. Ainda em relação ao látex, Almeida et al. (2014) mostraram o potencial angiogênico do látex extraído do caule de *H. speciosa* através do ensaio em ovos de galinha fertilizado. As membranas carioalantóides (CAM) submetidas ao tratamento com o látex apresentaram níveis de vascularização semelhante ao do Regederm®, pomada comercial, responsável pela regeneração de tecidos.

Apesar do potencial farmacológico, atualmente a mangabeira é utilizada principalmente para a produção de frutos, havendo poucos plantios comerciais no Brasil (LEDERMAN e BEZERRA, 2003). Na maioria dos estados produtores a produção de frutos que chega ao mercado e às indústrias de processamento é principalmente extrativista (CARVALHO et al., 2001). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2010) a produção de mangaba no Brasil decaiu entre os anos de 2004 (999 toneladas) a 2010 (722 toneladas). Essa queda de produção nos últimos anos gera preocupação em relação à conservação e uso sustentável, podendo ocasionar a diminuição ou até mesmo a extinção da espécie, como consequência do uso extrativista.

O crescente interesse pela cultura da mangaba, o seu potencial econômico e a ameaça de extinção são elementos que levam a investigar o atual conhecimento adquirido sobre a mangabeira. Sendo assim, um dos objetivos deste trabalho é realizar um estudo cienciométrico sobre a *H. speciosa*. A cienciométrica é um estudo quantitativo para identificar irregularidades, padrões ou tendências que possam existir em publicações de um determinado domínio da investigação científica, tendo como objetivos o esclarecimento e a maior visibilidade do desenvolvimento científico e tecnológico, identificando a concentração dos assuntos científicos, compreendendo como e quanto ocorre à troca de informações entre os cientistas, podendo ser empregada para auxiliar políticas para o desenvolvimento científico, além de influenciar na consolidação de grupos de pesquisa e integrar a produção de grupos de pesquisa (BARBOSA et al., 2012, MACIAS-CHAPULA, 1998; VANTI, 2002, HOUWES, 2012). Contribuindo de maneira significativa para o estudo dos indicadores científicos, tendo como meta a geração de informações e discussões, de forma a colaborar para a resolução de problemas encontrados na ciência moderna (SANTOS, 2003).

A cienciométrica não substitui um método analítico sobre determinado assunto, mas tem a capacidade de provocar maior visibilidade dos dados da pesquisa. Tal recurso é importante para identificar quais áreas de estudos precisam de maior atenção em cada campo

de atuação (LAURINDO e MAFRA, 2010). Uma das propostas desse trabalho é realizar um levantamento sobre o conhecimento científico da espécie *H. speciosa* com o objetivo de dar direcionamento às futuras pesquisas e auxiliar no delineamento de projetos de conservação, biologia, melhoramento genético e prospecção dessa área de atuação (LAURINDO e MAFRA, 2010).

O sucesso de qualquer programa de conservação e/ou melhoramento genético depende de um entendimento da quantidade e distribuição da variação genética presente na espécie. Tradicionalmente, uma combinação de características morfológicas e agrônômicas tem sido utilizada para medir a diversidade genética. No entanto, *H. speciosa* é uma planta heterogênea, com muitas características morfológicas que se sobrepõem. Além disso, muitas características vegetativas são influenciadas por fatores ambientais e apresentam uma variação contínua e elevada plasticidade, o que torna difícil a identificação em grupos taxonômicos distintos. Na tentativa de superar esses problemas, os marcadores moleculares têm sido comumente utilizados para monitorar a variabilidade genética de populações e espécies (DE MENEZES et al., 2014; GONZÁLES-PÉREZ et al., 2009; SONG et al., 2014).

Os marcadores moleculares são definidos como marcadores genéticos baseados na detecção de isoenzimas ou sequências de DNA (FALEIRO e ANDRADE, 2011). As principais vantagens dos marcadores moleculares em relação aos morfológicos e bioquímicos são: 1.) identificação de alta taxa de polimorfismos; 2.) identificação direta do genótipo sem influência do ambiente; 3.) possibilidade de detecção desses polimorfismos em qualquer estágio de desenvolvimento da espécie em estudo; e 4.) possibilidade de gerar maior quantidade de informação genética por loco (FALEIRO, 2007).

Os diferentes tipos de marcadores permitem estudos de evolução, diversidade genética inter e intraespecífica, de identificação de indivíduos, origem genética e identificação de novas variantes, gerando informações e dados genéticos, que são utilizados em diversos tipos de pesquisa, principalmente relacionadas a programas de conservação, caracterização e uso de recursos genéticos e programas de melhoramentos animal e vegetal (FALEIRO e ANDRADE, 2011). Além disso, os marcadores podem gerar uma quantidade de informações sobre a identificação genética de indivíduos, diversidade, frequência gênica, relacionamento filogenético, mapeamento genético, seleção assistida por marcador, sendo uma poderosa ferramenta em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético (BORÉM e CAIXETA, 2009).

A utilização de marcadores moleculares baseia-se principalmente na técnica de amplificação em cadeia pela polimerase (PCR e suas variações) e na técnica de hibridização.

Sendo os principais marcadores: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), Minissatélites, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e Microsatélites ou SSR (Single Sequence Repeat), SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) entre outros (DOS REIS, 2010).

De acordo com o conhecimento de cada um dos marcadores citados, optou-se neste estudo pela utilização dos marcadores do tipo RAPD, por possuir a vantagem de baixo custo e não precisarem de um conhecimento prévio do genoma da espécie e os marcadores SSRs devido a sua alta taxa de confiabilidade e a possibilidade de transferibilidade entre espécie da mesma família, sendo que a taxa de transferibilidade aumenta entre espécies do mesmo gênero, ou de gêneros estreitamente relacionados, do que entre gêneros distante de uma mesma família (MNEJJA et al., 2010).

O marcador do tipo RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA* (DNA polimórfico amplificado ao acaso) consiste em fragmentos de DNA amplificados por meio de PCR utilizando iniciadores “primers” curtos (geralmente dez nucleotídeos) de sequência aleatória (FALEIRO e ANDRADE, 2011). Assim a sequência alvo da amplificação é desconhecida, não sendo necessário o conhecimento prévio do genoma em estudo (CAPINAN, 2007). Outras vantagens dos marcadores RAPD são: 1.) baixo custo; 2.) facilidade e rapidez de obtenção dos marcadores e resultados; 3.) quantidade mínima de material genético para análise genotípica do indivíduo; 4.) identificar de grande quantidade de polimorfismos (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1995). Em contrapartida, possui limitações por se tratar de um marcador com polimorfismo binário (presença ou ausência), não permitindo a distinção de heterozigotos e limitando a quantidade de informações por loco (FALEIRO, 2007).

Os marcadores RAPDs são aplicados principalmente para análises de “*Fingerprinting*” molecular, diversidade genética e mapeamento genético (FALEIRO e ANDRADE, 2011). Tendo sido empregado para avaliar a diversidade genética em diversas culturas de frutíferas do Cerrado, dentre os quais pode-se citar os estudos com aceroleira (SALLA et al., 2002), com goiabeira (GOMES FILHO et al., 2010), com acessos de pitaya (JUNQUEIRA et al., 2010), com o maracujazeiro (NAKATANI et al., 2009) e com a mangabeira (COSTA et al., 2011; MOURA et al., 2011; MOURA et al., 2005; SILVA et al., 2011b).

Nessa proposta foi selecionado esse marcador devido às suas vantagens discutidas anteriormente, além de que os trabalhos citados que utilizaram esses marcadores estudaram áreas de ocorrência locais e esta pesquisa abrange uma maior área de dispersão da espécie, na tentativa de descrever a variabilidade genética das diferentes variedades da espécie e pelo fato

de não existir informação a respeito da genética de *H. speciosa*. Uma simples busca em banco de dado internacional (Genebank) mostrou que atualmente existem apenas seis sequências depositadas para essa espécie (pesquisa realizada em 07/10/2014 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore?term=%22HANCORNI%20SPECIOSA%22%20\[ORGAN\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore?term=%22HANCORNI%20SPECIOSA%22%20[ORGAN])).

Os marcadores microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*) consistem de sequências curtas variando de um a seis nucleotídeos, que se repetem em *tandem* no genoma, cujas regiões são delimitadas por sequências conservadas de DNA, sendo desenhados iniciadores específicos que complementem essas sequências únicas que flanqueiam os microssatélites, sendo o polimorfismo entre os indivíduos detectado pela variação no número de unidades de repetição (FALEIRO e ANDRADE, 2011).

Estes marcadores são co-dominantes, possibilitando a identificação entre homozigotos e heterozigotos, apresentam variações de tamanho entre os alelos e estão distribuídos aleatoriamente no genoma. Os segmentos amplificados apresentam um extenso polimorfismo resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetidos, assim constituindo um locus genético altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo, sendo um dos melhores métodos para estudos genéticos, podendo ser utilizados para a determinação do grau de relação entre indivíduos e/ou grupos de uma mesma espécie, para análise de ascendência (testes de paternidade) entre outros. Além de fornecer dados para estudos filogeográficos e filogenéticos, estes estudos são possíveis devido a três características existentes neste marcador, que são: a elevada abundância com ampla distribuição pelo genoma, a neutralidade e o alto polimorfismo (MÜLLER et al., 2010).

Os SSRs possuem uma classificação de acordo com a composição das sequências repetidas que são: repetições perfeitas, não apresentando nenhuma interrupção, por exemplo: GTGTGTGT; repetições imperfeitas, interrompidas por bases que não correspondem ao motivo, por exemplo: GTGTGTAGTGTGT e por repetições compostas, quando duas ou mais repetições de microssatélites estão dispostas adjacentes, por exemplo: GTGTGTCACACA (SIGRIST, 2009).

Podem ser encontrados em sítios codificantes e não-codificantes do genoma que são caracterizados em geral pelo polimorfismo ocorrido devido às altas taxas de mutação presente nesses locos, sendo uma possível causa da grande variabilidade de microssatélites explicada pelos erros que acontecem nos processos de recombinação (crossing-over desigual). Os elementos de transposição e o processo de deslizamento da DNA polimerase na replicação ou reparo do DNA ocorrem, podendo gerar mudanças drásticas, como a perda ou o ganho de um

grande número de repetição causando os polimorfismos nos microssatélites (PAIVA, 2013).

Os marcadores microssatélites (SSR) têm sido amplamente utilizados como uma ferramenta para respostas a várias perguntas sobre a genética de populações (GONZALES-PÉREZ et al, 2009; WANG et al., 2014). No entanto, os avanços no uso de microssatélites têm sido dificultado devido a necessidade do conhecimento prévio das sequências flanqueadoras das regiões de microssatélites, as quais são obtidas por montagem de biblioteca genômica e sequenciamento elevando custo e tempo gasto para desenvolver iniciadores específicos para cada locus das espécies nativas (ZUCCHI et al., 2003).

Uma alternativa para a aplicação dessa técnica em genomas desconhecidos é o uso do processo denominado transferibilidade, ou seja, a utilização de sequências flanqueadoras (marcadores SSR) de espécies conhecidas e próximas filogeneticamente à espécie em estudo.

Os marcadores EST são originados de regiões codificadoras, que são mais conservadas entre populações e espécies (SARGENT et al., 2007). Estes podem ser utilizados entre espécies relacionadas, através da transferibilidade entre espécies que ainda não apresentam sequências de DNA disponíveis para análise (ALVARENGA et al., 2011). Muitos estudos têm mostrado a possibilidade de utilização de iniciadores desenhados para uma espécie para outra espécie, pertencentes ao mesmo gênero ou mesmo entre diferentes gêneros (FAN et al, 2013; MATHITHUMILAN et al, 2013).

Esse mecanismo de transferibilidade pode possibilitar a construção de mapa comparativo entre as espécies relacionadas, além de reduzir o custo da genotipagem, contribuindo para o desenvolvimento de estudos de genética de populações. Estudos com árvores tropicais já demonstraram alta taxa de transferibilidade de SSR entre espécies arbóreas taxonomicamente relacionadas, como na *Leguminosae* e entre espécies de *Eucalyptus*, já a absoluta com 100% de transferibilidade de microssatélites foi encontrada entre *Caryocar brasiliense* e outras cinco espécies do mesmo gênero, que são *C. coriaceum*, *C. edule*, *C. glabrum*, *C. pallidum* e *C. villosu* (ZUCCHI, 2002). Essas frequências variam de quase 60% em eudicotiledôneas e perto de 40% em monocotiledôneas. Entre gêneros, as taxas de transferência são de aproximadamente 10% para eudicotiledoneas e quase nula para monocotiledôneas.

MISHRA et al. (2011) baseado no princípio da transferibilidade selecionaram vários marcadores SSR da espécie *Catharanthus roseus* e aplicaram em plantas com potencial medicinal obtendo uma boa taxa de amplificação. Como *H. speciosa* possui propriedades medicinais e é da mesma família que *C. roseus* um dos objetivos desse estudo foi avaliar o processo de transferibilidade de marcadores SSR de *C. roseus* para mangabeira.

Os marcadores moleculares são eficientes para detectar variabilidade genética, porém existem outras formas de avaliar esse tipo de variação entre populações e espécies. A citogenética é uma ferramenta que pode ser usada para esse intuito.

A citogenética vegetal é uma ferramenta muito útil na caracterização das espécies, podendo ser utilizadas na comparação da biodiversidade de diferentes populações (ou bancos de germoplasma), bem como na condução de programas de melhoramento das espécies economicamente promissoras.

Os estudos citogenéticos convencionais buscam definir as características dos cromossomos, como: número, morfologia e posição das constrições primária e secundária dos cromossomos. Essas caracterizações morfológicas dos cromossomos permitem a comparação entre categorias taxonômicas, com o mesmo número de cromossomos, e assim detectar possíveis variações entre eles, principalmente em relação ao comprimento, posição do centrômero, presença de satélites e constrições secundárias, além de inferir sobre o conteúdo de DNA, comparando-se o tamanho dos cromossomos. A descrição das características do conjunto cromossômico de uma espécie é conhecida como cariótipo (SOUZA, 2008). A determinação dos cariótipos em diferentes espécies tem contribuído para formulação de hipóteses filogenéticas com base nos dados cromossômicos, que associadas à observação de caracteres fenotípicos e da distribuição geográfica, podem contribuir para taxonomia e para o melhoramento genético (SILVA, 2007).

O uso das técnicas citogenéticas é um eficiente método para a caracterização de vários grupos vegetais ou mesmo diferentes espécies. Espécies importantes economicamente ou não, já tiveram seu cariótipo estudado, contribuindo de forma acentuada para o melhoramento de plantas. Pensando nisso, outro modo de se avaliar a variabilidade genética entre variedades de mangabeira é a avaliação da estrutura dos cromossomos. Uma revisão na literatura mostrou que existe apenas um estudo em mangabeira, o qual diz que o número de cromossomos da espécie é $2n = 22$ (PEDROSA et al., 1999). Contudo, o estudo não revelou informações sobre a caracterização morfológica desses cromossomos, e nem se existe variação no número e estruturas dos cromossomos das diferentes variedades de mangabeira.

OBJETIVO GERAL

O principal objetivo desta pesquisa foi realizar um levantamento sobre o atual conhecimento de *H. speciosa* e avaliar a variabilidade genética de mangabeira utilizando ferramentas moleculares e a citogenética clássica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar estudo cienciométrico sobre *H. speciosa*;
- ✓ Avaliar a transferibilidade de marcadores microssatélites de *C. roseus* para *H. speciosa*;
- ✓ Avaliar a variabilidade genética entre as diferentes variedades *H. speciosa*, utilizando marcadores moleculares e pela comparação citogenética dos cariótipos;
- ✓ Determinar se existe estruturação espacial da variabilidade genética.

MATERIAL E MÉTODOS

Levantamento Cienciométrico

Os artigos sobre *H. speciosa* foram obtidos de três bases de dados: ISI Web of Science, SCOPUS e Scielo, no período de 1945 até 2014. A busca bibliográfica foi realizada através do título, resumo e palavras-chave que continham as palavras: Mangabeira* OR mangaba* OR "*Hancornia speciosa*" OR "*Hancornia speciosa* Gomes*" OR "*H. speciosa*" OR "*H. speciosa* Gomes*". A análise foi conduzida para obter as seguintes informações: 1.) ano de publicação; 2.) periódico publicado; 3.) fator de impacto; 4.) número de citações; 5.) país de origem do primeiro autor; 6.) estado de origem do primeiro autor; 7.) local de origem do estudo; 8.) áreas de concentração dos estudos (i.e. ecológicos, farmacológicos, etc...); 9.) tipo de trabalho produzido (i.e. teórico-descritivo ou experimental); 10.) produção científica obtida por universidades ou empresas; e 11.) nome da universidade ou empresa que realizou o estudo.

Após a obtenção dos artigos publicados, foi realizada uma triagem para identificação e remoção das publicações repetidas entre as bases de periódicos. Após a separação fez-se a leitura dos resumos e/ou artigo completo, quando não se obtinha as informações necessárias nos resumos. Durante a leitura eliminou-se os artigos fora do tema de estudo, por exemplo, casos em que a palavra mangabeira se referia ao nome de um determinado autor ou a um local estudado, mas não estava relacionada a espécie.

A seguir, os dados foram submetidos à análise estatística. Foram realizadas as análises: 1.) descritiva básica (média e coeficiente de variação para o fator de impacto e número de citações) e 2.) teste de Correlação Linear de Pearson com 1.000 permutações para verificar se o número de artigos sobre a mangabeira tem aumentado ao longo do tempo. As análises foram feitas utilizando o programa R version 3.0.1 (R Development Core Team, 2010).

Obtenção do material e classificação morfológica

As amostras foliares de 34 diferentes variedades de mangabeira foram obtidas em 27 cidades diferentes, abrangendo nove estados brasileiros (Figura 3). As coletas foram realizadas com o apoio de colaboradores das diferentes cidades e enviadas via correio, em seguida foram congeladas para conservação do material até a extração do DNA, com exceção das amostras de Ipameri que foram coletadas no momento da extração. Após a obtenção, o

material foi submetido à classificação morfológica de acordo com Monachino (1945). O processo de classificação foi realizado em colaboração com o Prof. Ms. Ismael Martins Pereira da Universidade Estadual de Goiás, Unidade Universitária de Ipameri-GO.

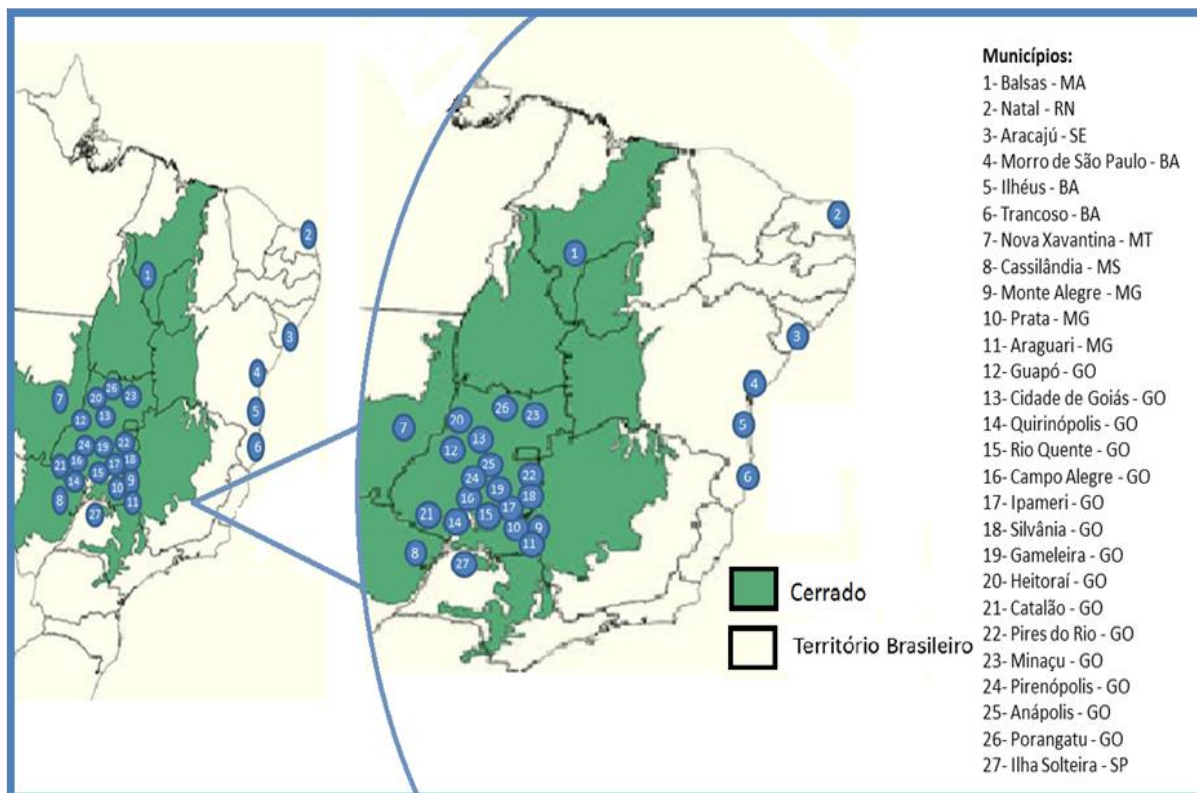


Figura 3: Mapa das regiões de ocorrência da mangabeira no território brasileiro e identificação dos locais de coleta das amostras realizadas nesse estudo.

Extração e análise do DNA

Foram obtidas amostras foliares dos distintos fenótipos, e a seguir as mostras foram submetidas à extração de DNA. A extração foi realizada a partir de folhas jovens pelo método CTAB (PAN et al., 2006). Para isso, foram macerados 300 mg de tecido foliar em nitrogênio líquido e adicionados 800 µl de tampão lise (100 mM de Tris-HCL, pH 8,0; 20 mM de EDTA; 2,8% de CTAB; 1,3M de NaCl; 1% de PVP e 0,5% de mercaptoetanol). O macerado foi mantido a 70° C por 1 h. A desproteíntização foi realizada adicionando-se 700 µl de clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1). A seguir, as amostras foram agitadas por 10 min e centrifugadas a 10.000g por 10 min. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos limpos e a seguir foram adicionados 55 µl de CTAB a 7% e o processo de desproteíntização foi repetido. A precipitação do DNA foi feita com isopropanol 99% resfriado a -2° C. Os tubos foram mantidos por 2 h a -20° C e em seguida centrifugados por 10 min a

10.000g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado em etanol 70% (v/v), secos à temperatura ambiente e re-suspendidos em 150 μ l de água ultrapura. Após a extração do DNA a qualidade do mesmo foi verificada através de eletroforese em gel de agarose (1%), corado com brometo de etídio. A concentração do DNA foi avaliada no aparelho NanoDrop 2000 (ThermoScientific), sendo todas as amostras de DNAs diluídos para a concentração padrão de 50ng/ μ l.

Amplificação do DNA

Após a verificação da concentração do DNA, o próximo passo foi à realização de teste de gradiente de amplificação, para verificar a melhor temperatura de anelamento para cada oligonucleotídeo estudado. A Figura 4 mostra um exemplo desse experimento para os marcadores SSRs: RG01, RG04, RG05, RG07, RG08, RG11, RG12, RG13, RG15, RG18, RG21 e RG30 nas temperaturas de 50, 53, 56 e 60°C.

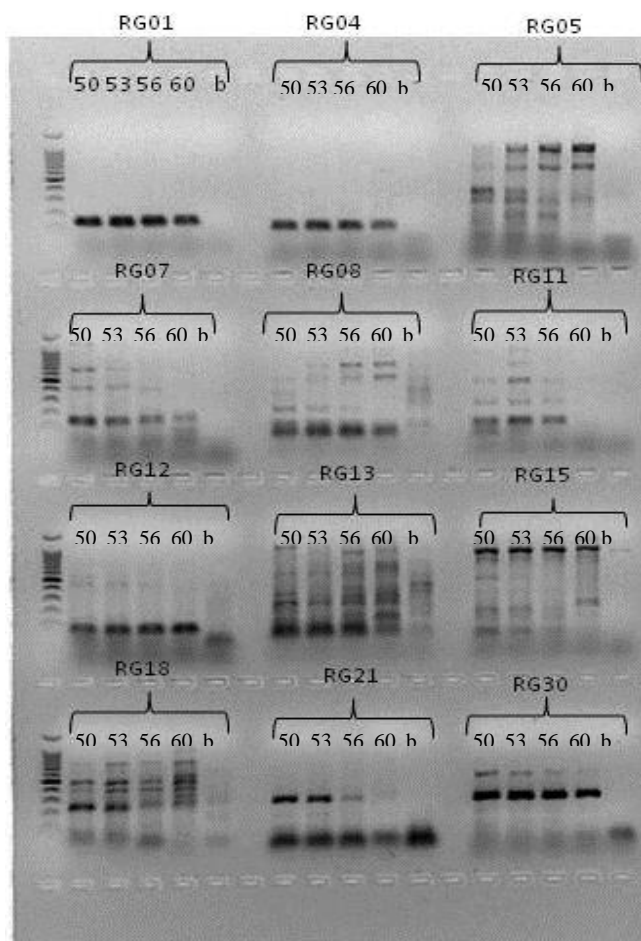


Figura 4. Gel ilustrativo do experimento de gradiente para escolha da melhor temperatura de anelamento para cada marcador. Marcadores utilizados: RG01, RG04, RG05, RG07, RG08, RG11, RG12, RG13, RG15, RG18, RG21 e RG30; temperaturas testadas: 50, 53, 56 e 60°C; b: controle negativo sem DNA.

Para a realização dos experimentos de amplificação do DNA foram utilizados dois tipos de marcadores moleculares, EST-SSR e RAPD. Os doze iniciadores EST-SSR selecionados para esse estudo foram descritos para a espécie *C. roseus*, a qual pertence à mesma sub-família da mangabeira e o qual apresentou transferibilidade para outras espécies da família Apocynaceae (MISHA et al., 2011). Para os marcadores RAPDs foram selecionados dez iniciadores previamente utilizados em estudos com plantas. A Tabela 1 apresenta a sequência dos marcadores selecionados para este estudo, o tamanho do fragmento esperado na amplificação e as referências bibliográficas as quais os marcadores foram extraídos.

Para a otimização das condições da reação de PCR com DNA das amostras, as mesmas foram realizadas em um volume total de 10 µl, contendo 50 ng de DNA, 10 mM de Tris-HCl, 1,5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 10 mM de dNTPs, 0,2 mM de oligonucleotídeo iniciador, 0,5 U de DNA polimerase AmpliTaq Gold™ (Life Technologies) para os marcadores SSRs e Taq polimerase (Thermo Scientific) para os marcadores RAPDs.

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador MJ Research PTC-200 com software de gradiente térmico para a otimização da temperatura de anelamento dos iniciadores, cujo mesmo possui um bloco para 96 amostras distribuídas em 8 linhas e 12 colunas. No gradiente de temperatura, cada coluna do termociclador segue uma temperatura de anelamento determinada, sendo a temperatura mínima utilizada de 50° C e a máxima de 65° C.

Os parâmetros utilizados para a amplificação dos marcadores foram: 1.) EST-SSR: desnaturação inicial a 94° C durante 10 min, seguido de 35 ciclos a 94° C durante 30 s (desnaturação), 50 a 65° C durante 30 s (anelamento dependendo do marcador microsatélite, Tabela 1), extensão a 72° C durante 30 s e uma extensão final a 72° C durante 7 min; e 2.) RAPD: desnaturação inicial a 94° C durante 1 min, seguido de 35 ciclos a 94° C durante 30 s (desnaturação), 40 a 42° C durante 30 s (anelamento dependendo do marcador RAPD, Tabela1), extensão a 72° C durante 30 s e uma extensão final a 72° C durante 7 min.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese utilizando géis de agarose a 3% (p/v) em tampão TBE 1X contendo brometo de etídio e fotografado sobre luz UV. Os produtos da PCR foram marcados como “1” para presente e “0” para amplificação ausente e os dados inseridos em uma matriz binária como variáveis discretas.

Tabela 1. Lista de marcadores utilizados para 34 amostras de mangabeira, com a identificação dos marcadores, sequências dos oligonucleotídeos e referências bibliográficas.

Marcador	Identificação	Sequências Oligonucleotídeos	Referências Bibliográficas
EST-SSR-RG01	gi 164561865	F:GGAACCAAGGATGTTAGAGTGG R:CTGCAACGGTTACTAGAGAGTAGAGC	Mishra et al., 2011
EST-SSR-RG04	gi 164556897	F: CGTCAAGACCTACCCAGGAG R: GTCTCCTCCGTCACCAGAAA	Mishra et al., 2011
EST-SSR-RG05	gi 164556756	F: CTGCTAGGCATGGTGGTGTAG R: GATCCCAGCGGTGACTCTTA	Mishra et al., 2011
EST-SSR-RG07	gi 164556449	F: GAGGAGGTGTCTCTCATGCTG R: CGACCTCAACAGAAGGTTTCG	Mishra et al., 2011
EST-SSR-RG08	gi 164555839	F: AGAAGGAAGTGGTGGTGCTG R: GTTACAGGGGGAGGAGGAG	Mishra et al., 2011
EST-SSR-RG11	gi 164561349	F: GGCACGAGGCATCCTTACTC R: CCACAGCTCTGGTAGCTCCT	Mishra et al., 2011
EST-SSR-RG12	gi 164561153	F: GGACAAGCTGGAGCAGCA R: CTGCAACCAGAGGCTTCC	Mishra et al., 2011
EST-SSR-RG13	gi 164560959	F: CCGGAGGTGATGAGGTTCTG R: GAGGCTGCTTTGGAGGAG	Mishra et al., 2011
EST-SSR-RG15	gi 164556819	F: GAGAGAGAGAGAGCGGCAAG R: GTGGGTCTCCACAATAGCG	Mishra et al., 2011
EST-SSR-RG18	gi 164561715	F: CATTCTTCTCTCGAGGCTTCTG R: ACCCCATGACAGTCAAGATAG	Mishra et al., 2011
EST-SSR-RG21	gi 164559832	F: CCCTTCCTGAGAGACTCAAATG R: CCAAGCACTTTCATCTCAGG	Mishra et al., 2011
EST-SSR-RG30	gi 164554493	F: GCCTCCAGTTACCCTTCCTC R: ACAGCAGGATCACCAAGACC	Mishra et al., 2011
RAPD-ITD04	-	TGATCCCTGG	Silva et al., 2011b
RAPD-ITD11	-	ACGGATCCTG	Silva et al., 2011b
RAPD-ITD13	-	CTACGGAGGA	Silva et al., 2011b
RAPD-ITD14	-	GGCACTGAGG	Silva et al., 2011b
RAPD-OPA03	-	AGTCAGCCAC	Lal et al., 2011
RAPD-OPC12	-	TGTCATCCCC	Lal et al., 2011
RAPD-OPD20	-	AACCCGGTCA	Lal et al., 2011
RAPD-OPN15	-	CAGCGACTGT	Lal et al., 2011
RAPD-OPAF5	-	CCCGATCAGA	Lal et al., 2011
RAPD-OPAF15	-	CACGAACCTC	Lal et al., 2011
RAPD-ITD13/ ITD11	-	CTACGGAGGA ACGGATCCTG	Silva et al., 2011b
RAPD-ITD13/ ITD14	-	CTACGGAGGA GGCACTGAGG	Silva et al., 2011b
RAPD-ITD4/ ITD11	-	TGATCCCTGG ACGGATCCTG	Silva et al., 2011b
RAPD-OPA03/ OPAF5	-	AGTCAGCCAC CCCGATCAGA	Lal et al., 2011

Análise dos resultados dos marcadores moleculares

Os produtos EST-SSR e RAPD foram avaliados como "1" para presente de um fragmento amplificado e "0" para a sua ausência, através dos quais o número total de fragmentos amplificados, polimórficas e porcentagem de polimorfismo foi obtido. A diversidade genética em 34 amostras foi calculada usando GENALEX 6.5 (PEAKALL e SMOUSE, 2012). A matriz de dados para os marcadores em conjunto foi usada para calcular a matriz de dissimilaridade, utilizando o coeficiente de Jaccard, de acordo com o método de Sneath e Sokal (1973), utilizando o programa DARWIN V 5.0 (PERRIER e JACQUEMOUD COLLET, 2006). As relações genéticas foram determinadas para os 34 amostras utilizando um método de agrupamento par a par não ponderado baseado em dendrograma das médias (UPGMA) com o programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011). A correlação cofenética também foi medida para avaliar o grau de ajuste dos aglomerados no dendrograma para os dados na matriz de coeficientes de dissimilaridade. Para confirmar a análise de agrupamento também foi realizada a análise de componentes principais (PCA) dos 34 amostras.

Análise citogenética

Para a análise citogenética, foram obtidas sementes de três variedades de *H. speciosa*: *pubensces*, *gardneri* e *speciosa*. Essas amostras foram coletadas na região de Anápolis e Ipameri, ambas cidades do estado de Goiás. As sementes foram colocadas em germinadores para a obtenção dos meristemas radiculares. Os mesmos foram tratados com hidroxiquinoleína (8-HQ) por 20 h a 20° C. A seguir as amostras foram fixadas em Carnoy 3:1 (álcool etílico P.A. e ácido acético glacial) à temperatura ambiente por até 12 h. Posteriormente, as raízes foram utilizadas no preparo de lâminas ou mantidas a -20°C até o uso.

Antes da coloração, as raízes foram hidrolisadas sobre uma solução de HCl (5M) por 20 minutos a temperatura ambiente. A seguir, as raízes foram dissecadas com a adição de uma gota de ácido acético 45% (v/v) e esmagadas com uma lamínula. As lamínulas foram retiradas após congelamento em nitrogênio líquido e as lâminas coradas em Giemsa/tampão fosfato 2% (p/v).

As lâminas foram observadas em microscópio óptico Carl Zeiss, modelo Axiovert 25, com objetiva de 100x, sendo que as células com boas condições para a contagem dos cromossomos foram fotografadas utilizando-se uma câmera digital Zeiss, AxioCam ERc 5s.

RESULTADOS

Análise cienciométrica

O levantamento bibliográfico realizado nas diferentes bases de dados utilizadas identificou um total de 583 artigos publicados entre os anos de 1945 a 2013. Deste total, foram eliminados após a triagem 229 artigos, os quais estavam repetidos em mais de uma base, 208 artigos que não abordaram o tema e 7 artigos publicados no ano 2014. Após essa varredura inicial restaram apenas 139 artigos para serem analisados nessa pesquisa. O baixo número de trabalhos sobre a *H. speciosa* já era esperado e foi um dos motivos que levou à realização deste estudo. Outro motivo para a realização desse levantamento é o fato da mangabeira possuir um grande potencial econômico, tanto para a produção de frutos como terapêutico, contudo, pesquisas tem demonstrado que a espécie corre risco de extinção (MANICA, 2002).

Em relação às áreas de conhecimento abrangidas pelos artigos publicados, percebe-se que os estudos agronômicos são os mais frequentes, seguidos por estudos farmacológicos e da engenharia de alimentos (Figura 5).

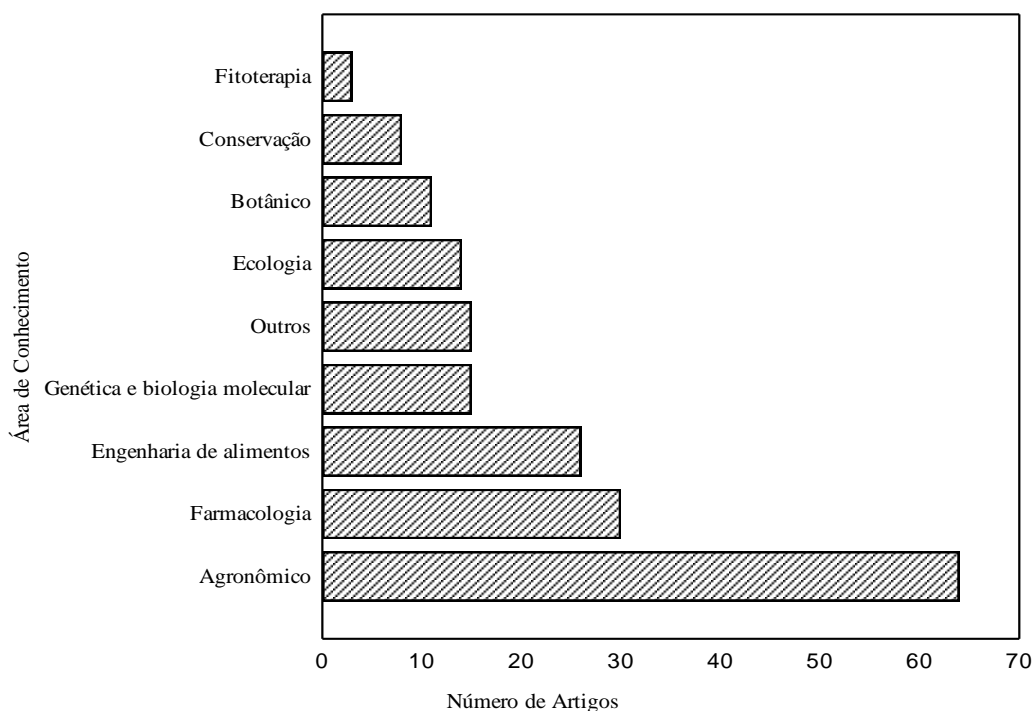


Figura 5: Áreas de conhecimentos em relação ao número de artigos publicados envolvendo *H. speciosa*.

Outro dado interessante encontrado nesse levantamento cientiométrico, foi em relação ao tipo de estudo realizado. Classificaram-se os artigos obtidos em relação ao fato de serem experimentais e/ou teóricos descritivos. O resultado evidencia a maior frequência de trabalhos experimentais com 84,17% dos artigos publicados em relação aos teóricos descritivos que apresentaram 15,82%. Esses trabalhos experimentais são bem diversificados e abrangeram desde estudos e caracterização de frutos até estudos moleculares.

Em relação à abrangência geográfica dos artigos, os resultados dessa pesquisa mostrou que a maioria dos artigos (58,27%) envolveram estudos com variedades locais, ou seja, com distribuição geográfica restrita. Adicionalmente, 37,97% dos artigos envolveram estudos com variedades coletadas em regiões geográficas mais abrangentes. Não foram identificados estudos com amplo espectro de distribuição, ou seja, que abrangessem toda a área de dispersão da espécie (Figura 6).

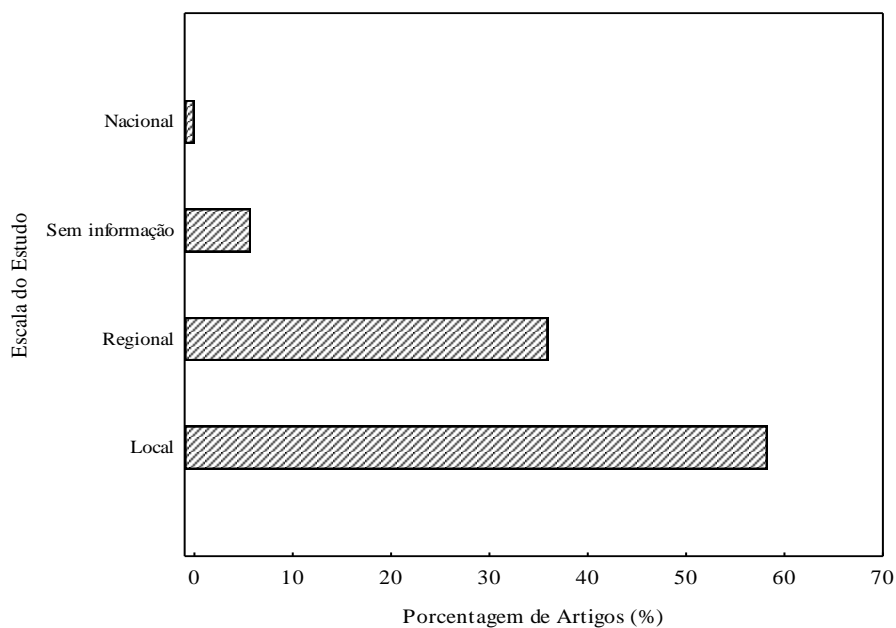


Figura 6: Escala de estudo em relação ao número de artigos.

Em relação ao órgão interessado em estudar a espécie, foi observado um maior interesse pelas Universidades do que pelas empresas em estudar *H. speciosa*, sendo a Embrapa a única empresa a realizar pesquisas com a espécie (Figura 7).

A Universidade Federal de Sergipe apresentou o maior número de pesquisa com a mangabeira, isso provavelmente decorre do fato da mangabeira ser uma das principais frutas nativas e muito consumida pela população local. Diferentes departamentos da Universidade Federal de Sergipe estudam diferentes aspectos da biologia, farmacologia, conservação e melhoramento genético dessa planta.

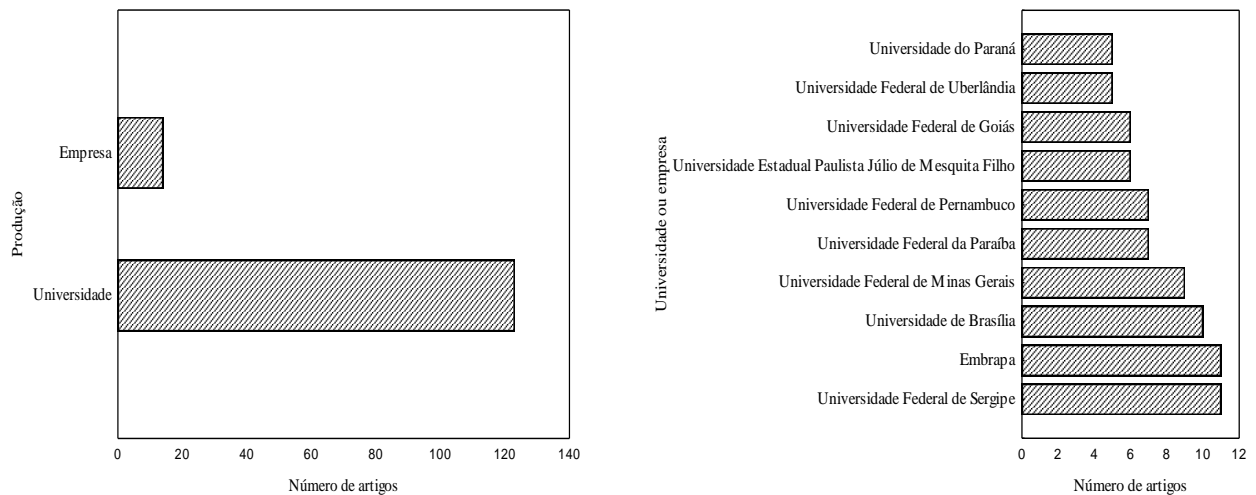


Figura 7: Tipo de produção e principais produtoras de artigos.

Outro aspecto que caracterizou maior interesse pela cultura de mangabeira nos estados produtores foi o levantamento da autoria dos trabalhos publicados sobre a espécie. A Figura 8 mostra que para a maioria dos trabalhos, o primeiro autor pertence aos estados de Sergipe, Goiás e Minas Gerais, os mesmos estados que apresentaram a maior produção de frutos.

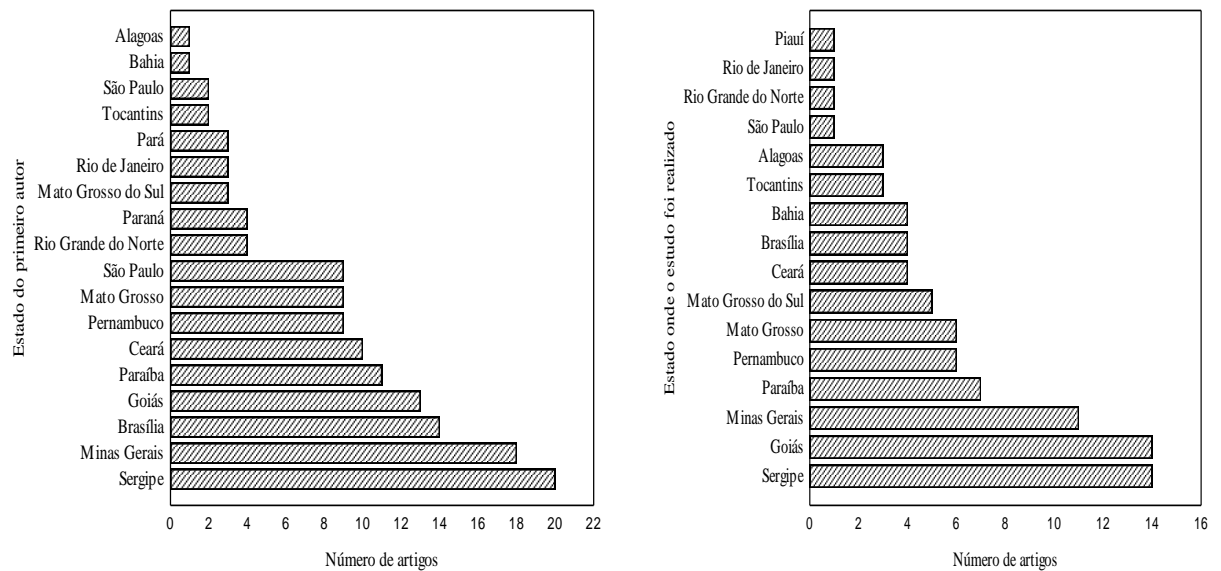


Figura 8: Estado do primeiro autor e local de realização do estudo.

Ao analisar o número de citações e o fator de impacto dos periódicos que publicaram sobre o tema analisado, percebeu-se que ambos os quesitos apresentaram baixos índices. O número de citações variou de 0 a 113 com a média de 7,38 e o desvio padrão de 12,43, enquanto que o fator de impacto variou de 0,8 a 3,53 com a média de 1,11 e o desvio padrão

de 1,04. Em relação ao fator de impacto, não houve variação significativa entre a média e o desvio; já em relação ao número de citações, a variação foi significativa, ou seja, existe uma grande variação entre a média das citações (Figura 9).

Já a análise da nacionalidade do primeiro autor, obteve-se 98,56% de brasileiros, 0,72% americanos e 0,72% portugueses, o que deixa evidente que a mangabeira ainda não despertou interesse pela sociedade científica mundial.

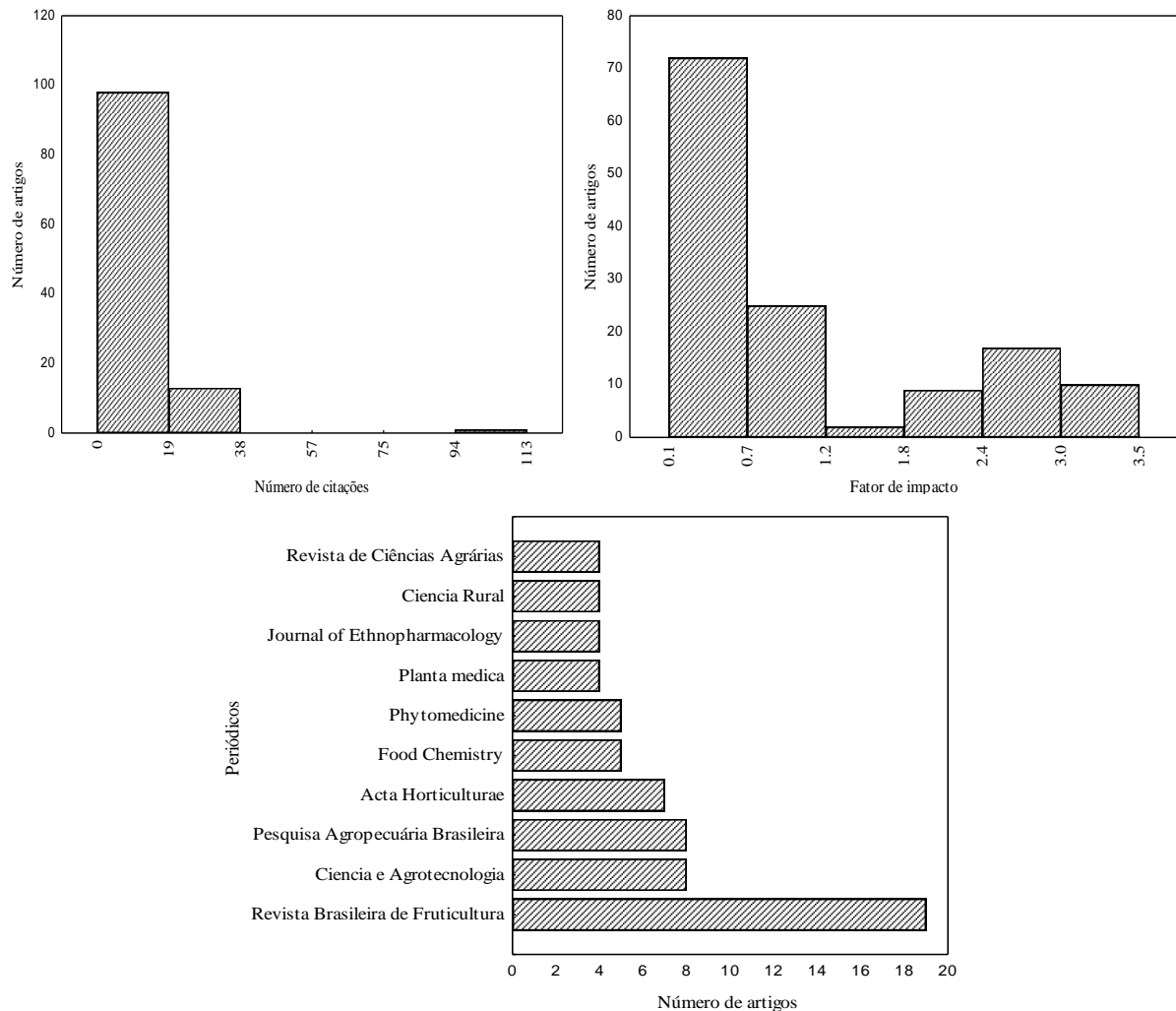


Figura 9: Número de citações, fator de impacto e os principais periódicos onde trabalhos com mangabeira foram publicados.

A correlação mensurada entre o número de artigos e ano de publicação indicou que houve um aumento significativo em relação ao número de artigos ao longo do tempo, sendo encontrado o valor de $p = 0,02$ ($p < 0,05$). Mesmo com o aumento do número de artigos publicados, o total de artigos ainda é considerado baixo, demonstrando que o interesse científico pela espécie ainda é recente, podendo ser observado que o aumento nas publicações iniciou por volta do ano de 2008 (Figura 10).

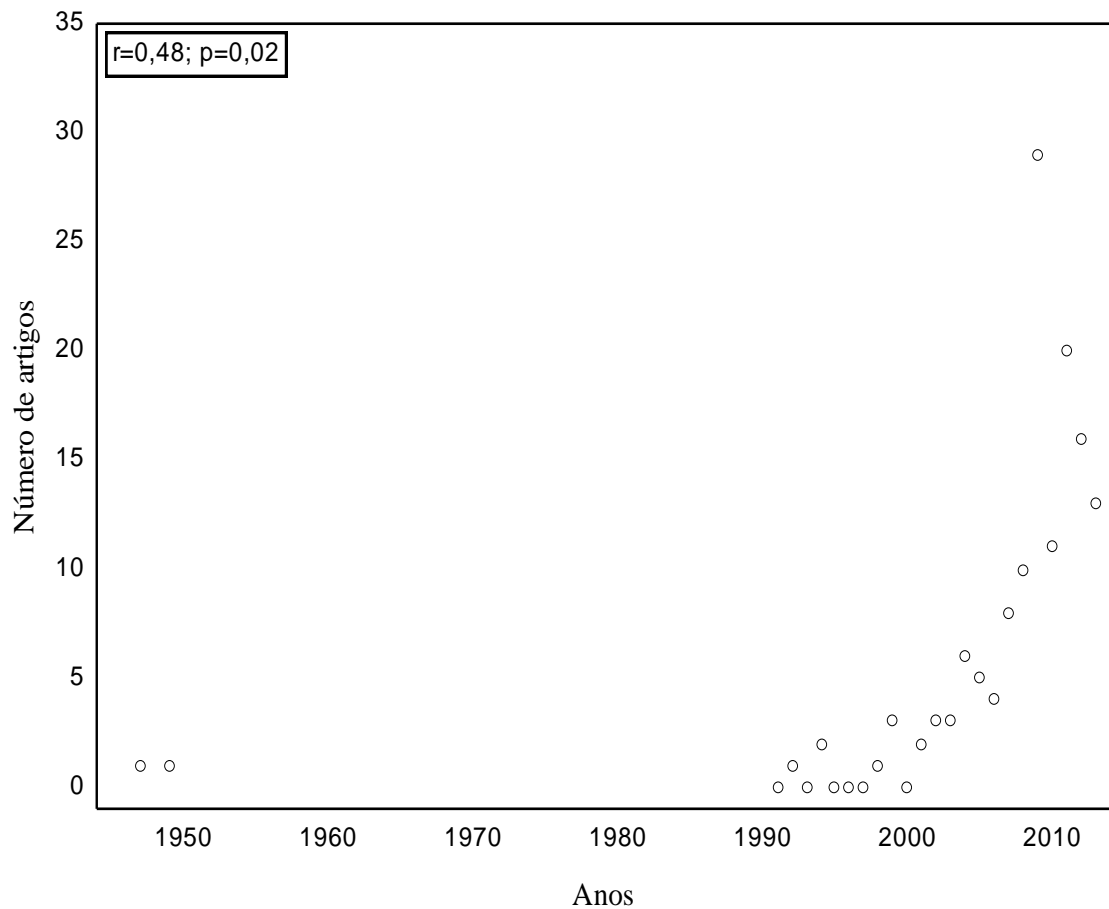


Figura 10: Correlação de Pearson para análise temporal entre número de artigos e anos de publicações.

Classificação morfológica das amostras de mangabeira coletadas

A partir das coletas realizadas em campo, foram obtidas 34 amostras de 27 cidades procedentes de nove estados brasileiros. Essas amostras foram classificadas morfológicamente segundo Monachino (1945). As amostras estão apresentadas na tabela 2, juntamente com as suas respectivas procedências, estados, coordenadas geográficas e classificação morfológica.

Amostras de três variedades foram depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Goiás, campus Anápolis e registrados com a seguinte numeração: *H. speciosa speciosa* (4875), *H. speciosa* var. *pubescens* (4914) e *H. speciosa* var. *gardneri* (5513). A seguir figura ilustrativa das exsicatas (Figura 11).

Tabela 2. Lista das 34 amostras de mangabeira, com a procedência, estado, classificação e coordenadas geográficas.

Número da Amostra	Procedência	Estado	Classificação	Coord. Geográficas
1	Natal	Rio Grande do Norte	<i>speciosa</i>	5°47'42"S, 35°12'32"W
2	Aracajú	Sergipe	<i>speciosa</i>	8°45'36"S, 35°06'18"W
3	Morro de S. Paulo1	Bahia	<i>speciosa</i>	10°54'36"S, 37°04'12"W
4	Ilhéus	Bahia	<i>speciosa</i>	13°23'22"S, 38°54'36"W
5	Trancoso	Bahia	<i>speciosa</i>	14°48'11"S, 39°02'22"W
6	Morro de S. Paulo2	Bahia	<i>speciosa</i>	10°54'36"S, 37°04'12"W
7	Nova Xavantina	Mato Grosso	<i>lundii</i>	14°40'0"S, 52°20'45"W
8	Cassilândia	Mato Grosso	<i>lundii</i>	19° 7' 9"S, 51° 44' 16"W
9	Monte Alegre	Minas Gerais	<i>cuyabensis</i>	16°34'84"S, 39°05'36"W
10	Prata	Minas Gerais	<i>maximiliani</i>	18°52'14"S, 48°52'51"W
11	Araguari	Minas Gerais	<i>maximiliani</i>	19°18'26"S, 48°55'27"W
12	Guapó	Goiás	<i>gardneri</i>	16°49'50"S, 49°31'55"W
13	Cidade de Goiás	Goiás	<i>gardneri</i>	16°56'02"S, 48°57'10"W
14	Quirinópolis	Goiás	<i>gardneri</i>	18°26'52"S, 50°27'07"W
15	Rio Quente	Goiás	<i>gardneri</i>	17°46'28"S, 48°46'21"W
16	Campo Alegre	Goiás	<i>gardneri</i>	17°37'59"S, 47°46'42"W
17	Ipameri 1	Goiás	<i>gardneri</i>	17°42'59"S, 48°08'42"W
18	Ipameri 2	Goiás	<i>gardneri</i>	17°42'59"S, 48°08'42"W
19	Ipameri 3	Goiás	<i>gardneri</i>	17°43'51"S, 48°09'17"W
20	Ipameri 4	Goiás	<i>gardneri</i>	17°43'51"S, 48°09'17"W
21	Silvânia	Goiás	<i>gardneri</i>	16°39'32"S, 48°36'29"W
22	Heitorai	Goiás	<i>gardneri</i>	15°43'7"S, 49°48'54"W
23	Catalão 1	Goiás	<i>gardneri</i>	18°05'58"S, 47°58'33"W
24	Catalão 2	Goiás	<i>gardneri</i>	18°02'07"S, 47°59'28"W
25	Pires do Rio	Goiás	<i>gardneri</i>	17°18'2"S, 48°17'1"W
26	Minaçu	Goiás	<i>gardneri</i>	10°16'89"S, 48°33'17"W
27	Pirenópolis	Goiás	<i>gardneri</i>	15°85'00"S, 48°95'00"W
28	Anápolis	Goiás	<i>gardneri</i>	16°19'36"S, 48°57'10"W
29	Porangatu 1	Goiás	<i>gardneri</i>	13°26'46"S 49°8'17"W
30	Porangatu 2	Goiás	<i>gardneri</i>	13°26'46"S 49°8'17"W
31	Ilha Solteira	São Paulo	<i>gardneri</i>	20°25'58"S, 51°20'32"W
32	Balsas	Maranhão	<i>pubescens</i>	7°31'59"S, 46°2'6"W
33	Ipameri 5	Goiás	<i>pubescens</i>	17°43'51"S, 48°09'17"W
34	Gameleira	Goiás	<i>pubescens</i>	16°24'35"S, 48°42'21"W

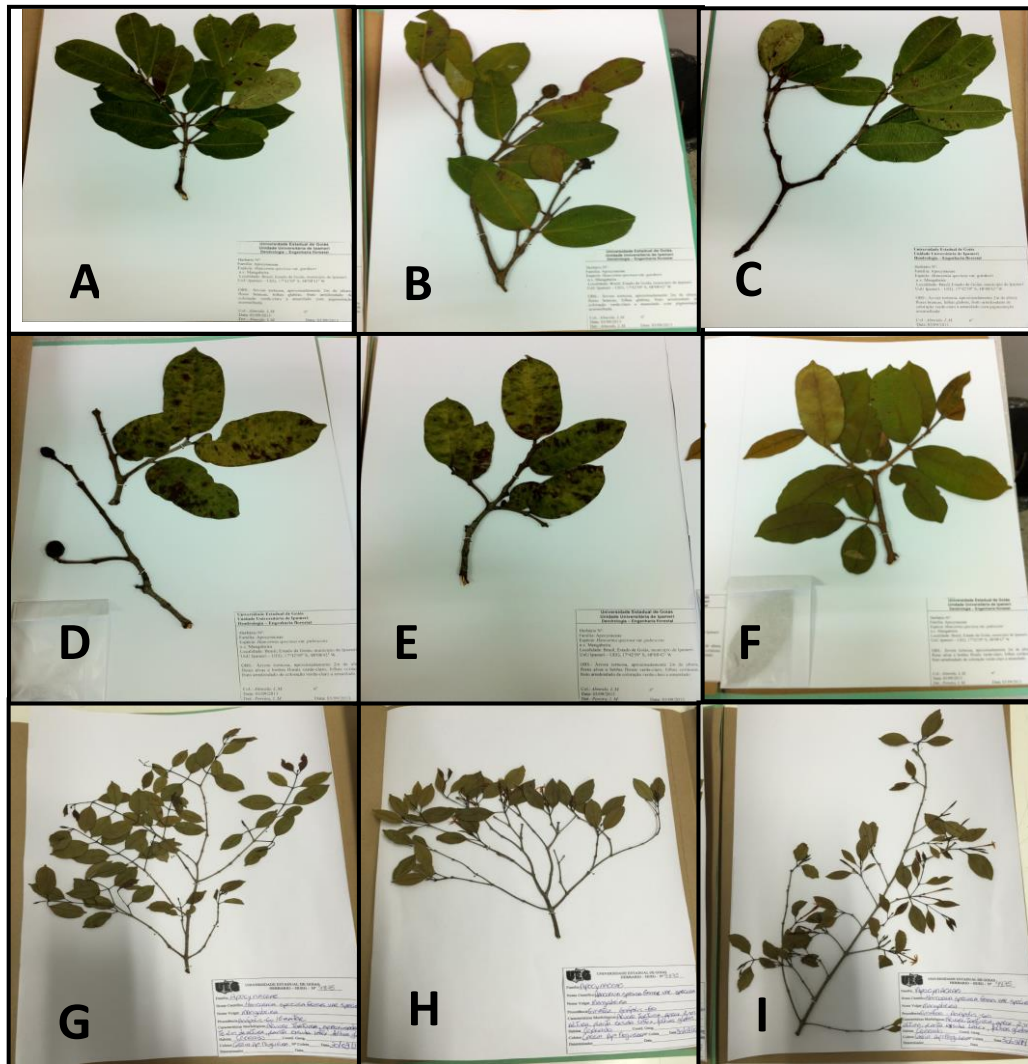


Figura 11. Fotografias das exsicatas classificadas durante o estudo e depositadas no herbário da Universidade Estadual de Goiás (UnUCET – Anápolis). **A a C:** *H. speciosa* variedade *gardineri*; **D a F:** *H. speciosa* variedade *pubescens* e **G a I:** *H. speciosa* variedade *speciosa*.

Amplificação do DNA:

Após a escolha das temperaturas de anelamento (Tabela 3), as amostras de DNAs foram submetidas à amplificação em PCR, conforme a metodologia descrita. Os produtos da amplificação foram observados e avaliados através do gel de agarose em eletroforese. A Figura 12 mostra um gel demonstrativo de dois tipos de marcadores estudados. Os marcadores RAPDs são representados pelos marcadores IDT4/IDT11 e os marcadores EST-SSRs pelo RG30.

Tabela 3. Temperaturas de anelamento dos marcadores EST-SSR e RAPD.

Marcador	Temperatura de anelamento	Marcador	Temperatura de anelamento
EST-SSR-RG01	55°C	RAPD-ITD04	37
EST-SSR-RG04	55°C	RAPD-ITD11	37
EST-SSR-RG05	56°C	RAPD-ITD13	37
EST-SSR-RG07	56°C	RAPD-ITD14	37
EST-SSR-RG08	56°C	RAPD-OPA03	42
EST-SSR-RG11	56°C	RAPD-OPC12	42
EST-SSR-RG12	55°C	RAPD-OPD20	42
EST-SSR-RG13	60°C	RAPD-OPN15	42
EST-SSR-RG15	63°C	RAPD-OPAF5	42
EST-SSR-RG18	60°C	RAPD-OPAF15	42
EST-SSR-RG21	53°C	RAPD-ITD13/ITD11	42
EST-SSR-RG30	55°C	RAPD-ITD13/ITD14	42
		RAPD-ITD4/ITD11	42
		RAPD-OPA03/OPAF5	42

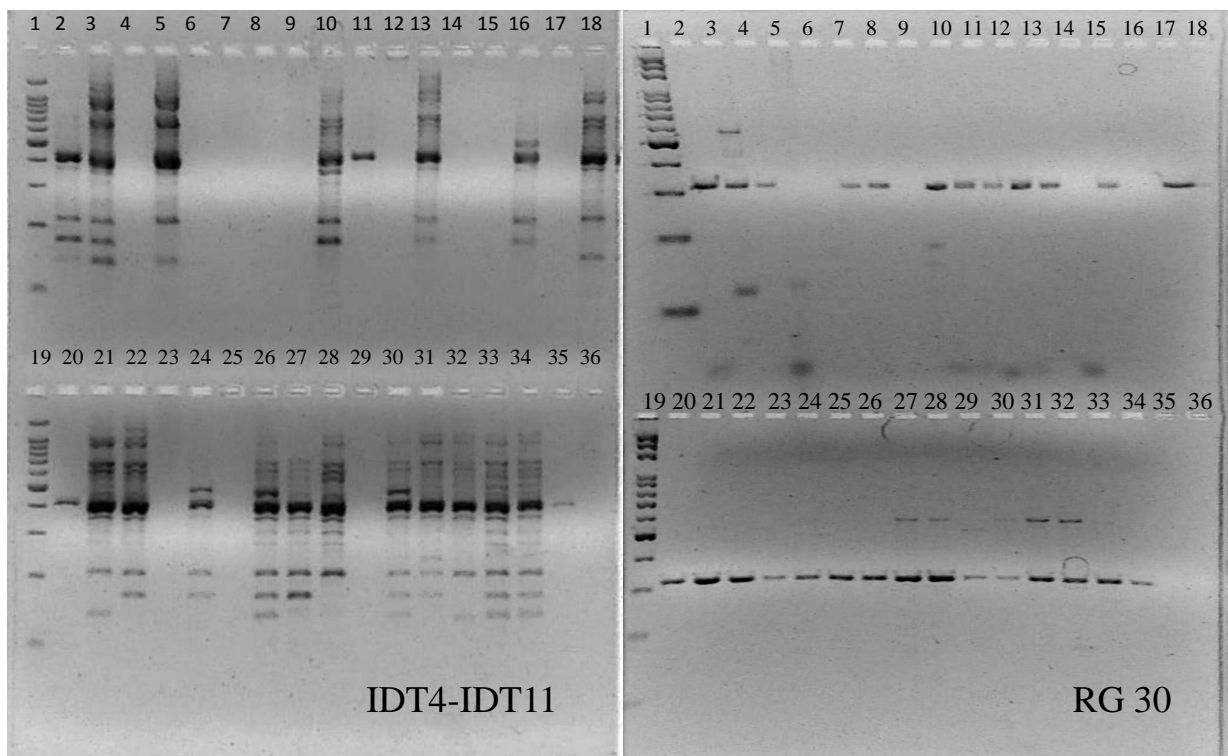


Figura 12: IDT4-IDT11 e RG30: 1: Marcador molecular (*ladder* 100pb); 2: Balsas; 3: Natal; 4: Aracajú; 5: Morro de São Paulo 1; 6: Ilhéus; 7: Trancoso; 8: Morro São Paulo 2; 9: Cassilândia; 10: Monte Alegre; 11: Prata; 12: Araguari; 13: Guapó; 14: Cidade de Goiás; 15: Quirinópolis; 16: Rio Quente; 17: Campo Alegre; 18: Ipameri 1; 19: Marcador molecular (*ladder* 100 pb); 20: Ipameri 2; 21: Ipameri 3; 22: Ipameri 4; 23: Ipameri 5; 24: Silvânia; 25: Gameleira; 26: Heitorá; 27: Catalão 1; 28: Catalão 2; 29: Pires do Rio; 30: Minaçu; 31: Pirenópolis; 32: Anápolis; 33: Porangatu 2; 34: Porangatu 1; 35: Ilha Solteira; e 36: Nova Xavantina.

Transferibilidade de marcadores EST-SSR

Os 12 iniciadores testados foram classificados de acordo com a qualidade da amplificação obtida nos experimentos de PCR em: marcadores que geraram produtos de amplificação de EST-SSR (75% ou 9 pares de iniciadores), marcadores que não apresentaram amplificação de fragmento específico (16,7% ou 2 marcadores) e marcadores que não tiveram produtos de amplificação (8,3% ou 1 marcador). Dos nove marcadores que apresentaram amplificação específica, quatro foram monomórficos e cinco foram polimórficos. O total de alelos identificados foi de 14 alelos, com uma variação de dois a três alelos por loco gênico. A Tabela 4 mostra a caracterização genética dos cinco microssatélites em 34 amostras de mangabeira. Embora não haja excesso ($F_{IS} < 0$) ou deficiência ($F_{IS} > 0$) para alguns dos locos heterozigotos estudados, a diversidade genética média ($H_e = 0,226 \pm 0,017$) não difere significativamente da heterozigosidade observada ($H_o = 0,194, \pm 0,039$); quando se considera o erro padrão da média. Esse resultado indica que não existe um padrão de distribuição intra ou interloco, o que é caracterizado pela baixa variação na taxa média de endogamia ($F_{IS} = 0,119 \pm 0,157$).

Tabela 4. Caracterização genética de cinco microssatélites em 34 amostras de mangabeira.

Locus	Alelos (bp)	A	H_o	H_e	F_{IS}
RG07	159, 177, 193	3	0.095	0.260	0.625
RG08	63, 75, 99	3	0.273	0.255	-0.119
RG12	113, 177, 195	3	0.107	0.168	0.351
RG21	193, 313	2	0.273	0.241	-0.158
RG30	326, 447, 603	3	0.222	0.205	-0.106
Total		14	0.194	0.226	0.119
Stand Erro		-	0.039	0.017	0.157

A: número de alelos; **H_o :** heterozigosidade observada; **H_e :** heterozigosidade esperada; **F_{IS} :** coeficiente de endogamia.

Estimativa de diversidade genética da espécie e associação com a distribuição geográfica

Análise dos coeficientes de dissimilaridade de Jaccard, calculado com base na presença e ausência de marcadores RAPD e EST-SSR, mostraram que os coeficientes de similaridade eram altamente semelhantes, indicando um elevado grau de associação entre o dendograma e matrizes de dissimilaridade. Com base nesse resultado, optou-se por usar os

dois marcadores para estimar a diversidade genética. A dissimilaridade média obtida foi de 0,80 considerando que a dissimilaridade máxima observada foi de 1,0 e o mínimo de 0,34. A correlação entre divergência genética e distância geográfica das diferentes variedades de *H. speciosa* mostrou que estes dois parâmetros estão positivamente correlacionados, mas não de forma significativa (coeficiente de correlação, $r = 0,17$). Análise de agrupamento genético foi realizada utilizando o método de agrupamento par a par com média aritmética não ponderada (UPGMA). A análise de agrupamento dividiu os 34 amostras estudadas em seis grupos principais (Figura 13). Não houve associação entre a diversidade genética e distribuição geográfica, uma vez que as variedades coletadas em regiões distantes foram agrupadas, por exemplo: amostras da Bahia (Morro SP 1) e de São Paulo (Ilha Solteira) foram agrupadas com diferentes amostras de Goiás; amostras do Maranhão (Balsas), Rio Grande do Norte (Natal), Goiás (Guapó) foram agrupadas com as da Minas Gerais (Monte Alegre); amostras de Mato Grosso (Nova Xavantina) foram agrupados com os da Bahia (Morro SP2); amostras de Sergipe (Aracaju), Goiás (Pires do Rio) e Bahia (Trancoso) foram agrupadas com Minas Gerais (Prata). Este resultado sugere que não existe uma estruturação espacial da variabilidade para as diferentes variedades de *H. speciosa*.

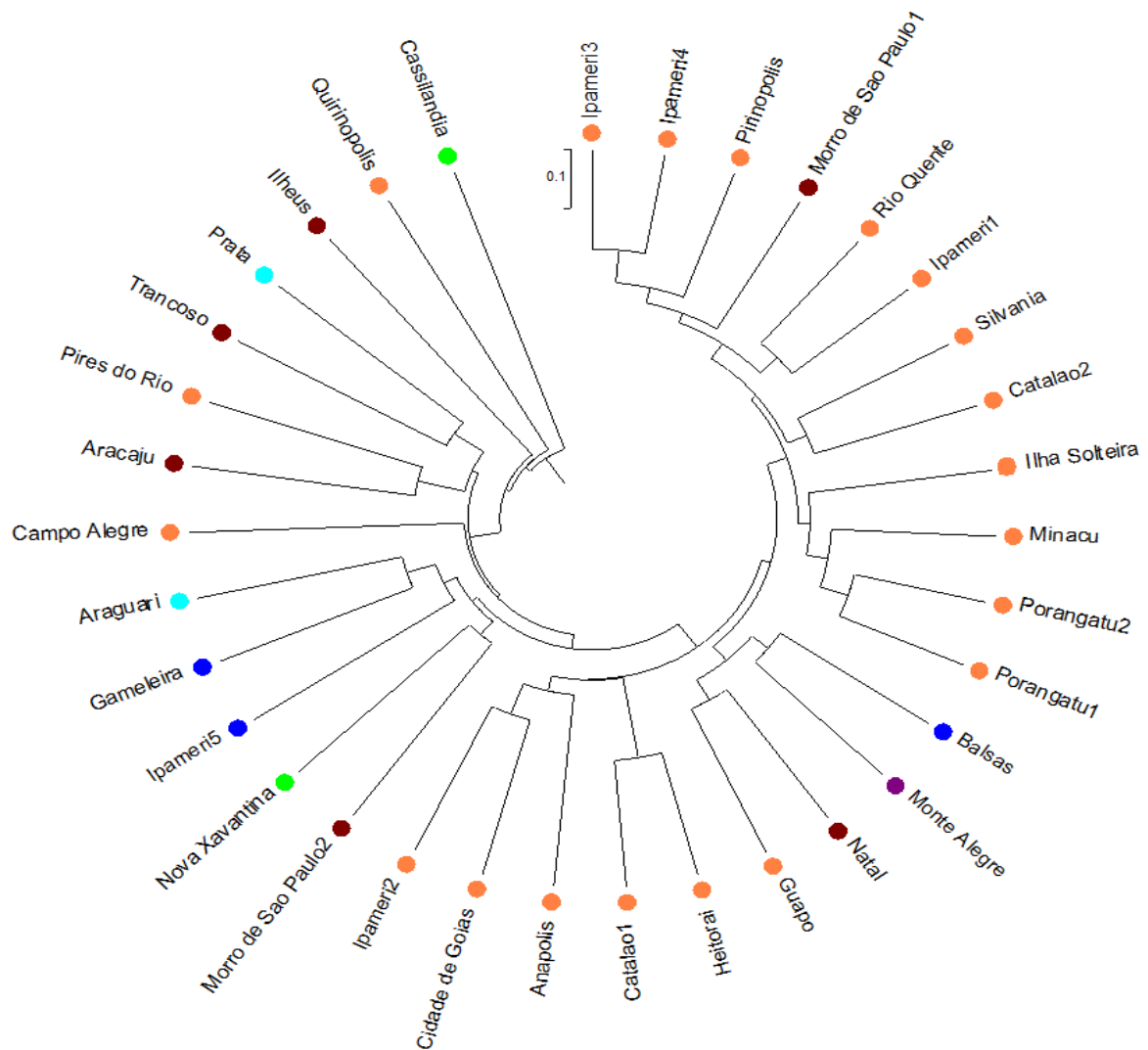


Figura 13. Dendrograma representando a distância genética para regiões de *H. speciosa* utilizando marcadores EST-SSR e RAPD.

Avaliação da divergência genética entre as variedades botânicas de *H. speciosa*

Uma análise de variância molecular (AMOVA) e de componentes principais (PCA) foi realizada para avaliar a variabilidade genética entre as diferentes variedades botânicas da *H. speciosa*. A variação molecular entre as variedades botânicas não foi significativa (0,03) e a PCA não detectou uma diferenciação entre as variedades botânicas (Figura 14). Deste modo, este resultado demonstra que o número de marcadores moleculares utilizados no estudo, não foram suficientes ou capazes de distinguir de variabilidade genética das diferentes variedades de *H. speciosa*.

possível a visualização cromossômica da espécie nas três diferentes variedades estudadas (Figura 15).

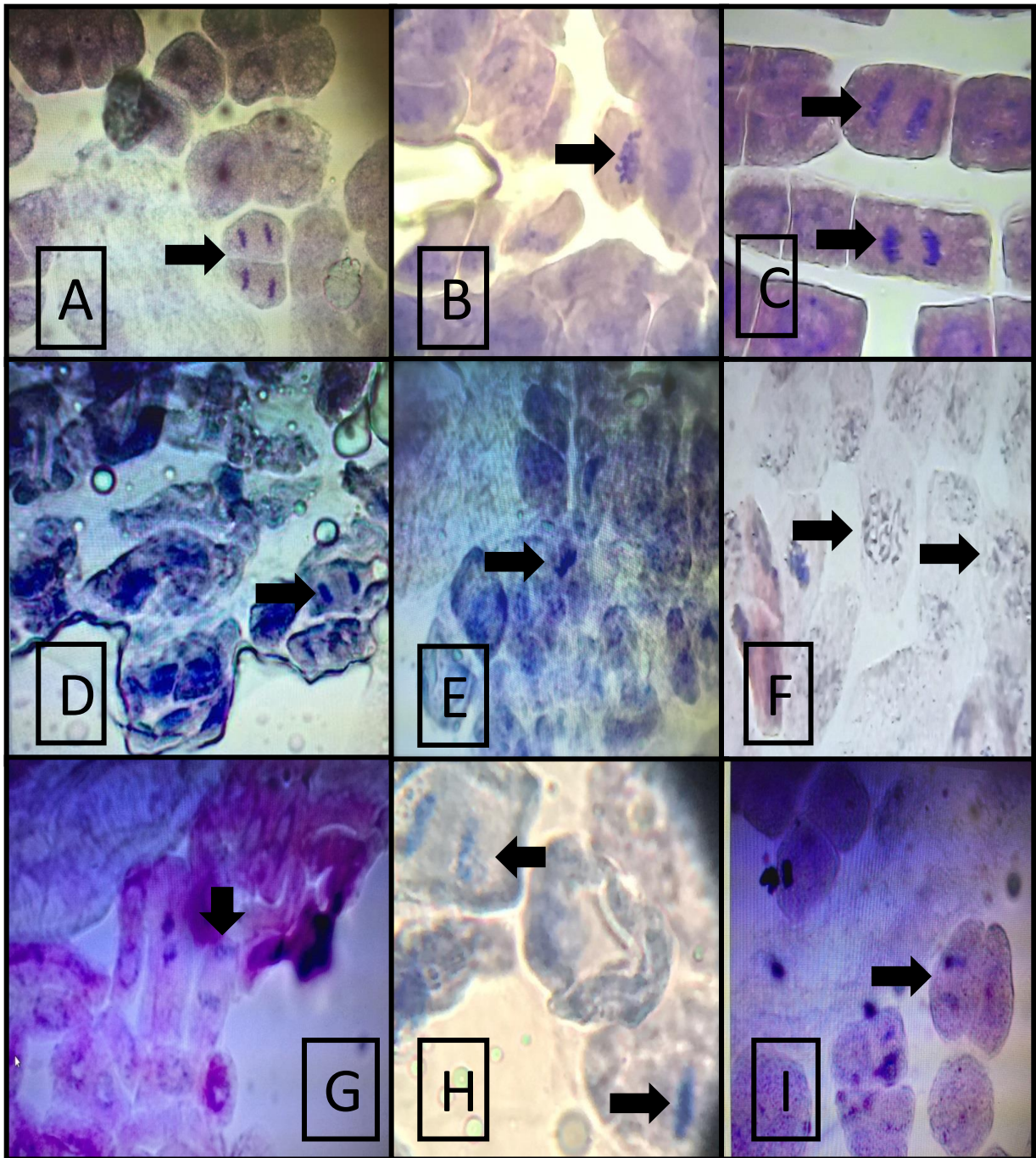


Figura 15. Fotografias dos cromossomos da *H. speciosa*. A a C: *H. speciosa* variedade *speciosa*; D a F: *H. speciosa* variedade *pubescens* e G a I: *H. speciosa* variedade *gardneri*. As figuras A; C; D; G; H e I: Anáfase, B; E e H: Metáfase; e F: Prófase.

DISCUSSÃO

Os estudos cientiométricos foram realizados com o objetivo de mostrar a importância da espécie *H. speciosa*, fomentar e direcionar futuras pesquisas sobre a planta, uma vez que poucos artigos científicos foram publicados sobre a espécie, e muito pouco se sabe sobre a biologia, taxonomia, genética, cultivo, processamento e conservação da mangabeira.

O levantamento bibliográfico realizado utilizando bases de dados internacionais (ISI Web of Science, SCOPUS e Scielo) identificou um total de 139 artigos científicos sobre a *H. speciosa*. Esse baixo número revela o pouco interesse da comunidade científica em relação à espécie. Contudo, esse panorama parece estar se modificando, pois a análise temporal dos dados mostrou que houve um aumento significativo no número de artigos nos últimos anos (Figura 10). Além disso, a qualidade dos meios de comunicação, nos quais foram publicados os artigos sobre a mangabeira melhoraram nos últimos anos. Isso é imprescindível para divulgar a importância dessa cultura e fomentar pesquisas com a espécie.

Em relação à área do conhecimento dos artigos publicados sobre a *H. speciosa*, os resultados obtidos na presente pesquisa demonstraram que os principais focos de estudo são as áreas agrônomicas e de processamento de frutos (Engenharia de alimentos). Isso se justifica pelo fato do principal interesse comercial da planta ser o fruto e seus derivados. Apesar de toda a valorização recente da mangaba, a exploração dos frutos ocorre de duas formas: 1.) extrativista, sem investimento, em pomares nativos pelas populações locais; e 2) pomares cultivados tecnicamente (FERREIRA e MARINHO, 2007), este último em menor escala embora haja um processo de formação de pomares por empresários para atender a crescente demanda na região nordeste (MOTA et al., 2005). Os maiores produtores da fruta são os estados de Sergipe, Minas Gerais e Bahia (SOARES et al., 2005), entretanto segundo Sousa et al. (2005) a crescente expansão imobiliária e o aumento de monoculturas como a cana-de-açúcar têm diminuído as de mangabeiras nativas e em contra partida está ocorrendo um aumento na demanda, acarretando uma maior exploração, levando ainda mais a devastação ou até mesmo a perda de variedades da espécie (LIMA, 2008).

Outra área de interesse que vem crescendo nos últimos anos é a de produção de fármacos. Silva et al. (2011a) descreveram as folhas de *H. speciosa* como eficientes para controlar a pressão arterial, já a casca pode ser usada no tratamento de gastrite causada por *Helicobacter pylori* (MORAES et al., 2008) e o látex possui propriedades anti-inflamatórias, antioxidante e angiogênica (ALMEIDA et al., 2014; MARINHO et al., 2011; SAMPAIO, 2008). Mesmo com esses trabalhos que comprovam o potencial da espécie, ainda existem

poucos estudos sobre os compostos ativos de interesse medicinal presentes nessa planta. No ano de 2013, por exemplo, foram encontrados apenas dois trabalhos publicados. Esse baixo número de artigos pode estar relacionado à falta de repercussão dos estudos anteriores, uma vez que a maioria dos trabalhos foram publicados em periódicos nacionais o que induz a baixa visibilidade no meio científico, perdendo a possibilidade de interesse em âmbito internacional pela espécie.

Outro levantamento realizado foi em relação ao tipo de produção científica obtida com a mangabeira. Foi identificado um maior número de trabalhos experimentais em relação aos trabalhos teórico-descritivos. A falta de trabalhos teórico-descritivos dificulta a caracterização da biologia da espécie, levantamento do local de ocorrência e estudos da influência sociocultural da espécie. Estudos teórico-descritivos básicos auxiliam, em muitos casos, na elaboração das metodologias a serem empregadas nos estudos experimentais. No caso da *H. speciosa* esses estudos contribuiriam para o melhor conhecimento da biologia da espécie. Um exemplo seria auxílio na classificação da espécie, a qual apresenta uma grande plasticidade morfológica (MOURA, 2003) e atualmente existem discussões sobre o número de variedades botânicas e a ocorrência de sinonímias (KOCH et al., 2014; MONACHINO, 1945).

Ao analisar a abrangência geográfica dos estudos foi identificado um maior número de trabalhos locais comparados aos regionais (Figura 6). Isso pode ser consequência do fato dessa espécie ser utilizada pelas populações locais tanto pela comercialização dos frutos quanto pela utilização na medicina popular, aumentando o interesse por pesquisadores locais (CARNELOSSI, 2009). Outro indicador desse resultado pode estar relacionado à dificuldade na obtenção de material de estudo e mesmo na identificação da espécie, já que ocorre queda das folhas antes da floração e a frutificação ocorre normalmente uma vez por ano (SOARES et al., 2005). Esse resultado também justifica um dos objetivos desta pesquisa, o de utilização de marcadores moleculares em diferentes regiões de coletas, buscando abranger uma ampla área de dispersão da espécie e o maior número de variedades botânicas possíveis.

No levantamento obtido sobre tipos de produção foi identificado um maior número de estudos realizados por universidades ao invés de empresas (Figura 7), sendo a Embrapa apresentada como a única empresa que realiza pesquisas com a mangabeira atualmente. O foco das pesquisas realizadas pela Embrapa vai desde a produção de mudas, precocidade de frutificação, produtividade, entre outras características agronômicas (COHEN e SANO, 2010), buscando melhores formas de cultivo, visto que até o momento o principal tipo de consumo ainda é extrativista o que pode juntamente com outros fatores levar a extinção da espécie (VIEIRA NETO et al., 2009).

Já as Universidades contam com o apoio de instituições de financiamento à pesquisas para o desenvolvimento de tecnologias aplicadas à cultura de mangabeira, devido a sua grande potencialidade socioeconômica (SOUSA et al., 2005). Além de fazerem parceria com as empresas para a realização de seus estudos como o caso do estudo realizado por Silva et al. (2013), geram assim uma maior quantidade de produção de trabalhos publicados.

Em relação ao estado do autor e ao local estudo, observou-se que ambos ocorrem em maior escala no estado de Sergipe (Figura 8). Esse resultado é devido ao fato da maior região produtora de mangaba ser o nordeste, com o Sergipe em primeiro lugar com 54,2%; seguidos da Bahia, com 15,5%; da Paraíba, com 13,1%; do Rio Grande do Norte com 11,7%; de Alagoas com 4,9%; do Maranhão e de Minas Gerais com 0,1% cada, na produção nacional (IBGE, 2012). Um dos fatores para o baixo número no estado de Minas Gerais deve-se ao não aproveitamento do potencial produtivo, por coletarem em pequenas propriedades e pela venda ser realizada por uma única cooperativa, enquanto que no Sergipe a colheita é realizada que forma organizada, chegando ao total de 93,7% de aproveitamento da polpa, o produto é comercializado em feiras livres e também para a Conab (Companhia Nacional de Abastecimento). A produção no Sergipe é de 700 toneladas safra/ano, e em Minas Gerais apenas 200 toneladas safra/ano (Conab, 2014).

O levantamento do fator de impacto, número de citações e periódicos em que os artigos foram publicados demonstraram baixos índices, e a maioria das revistas que publicaram foram brasileiras (Figura 9). Esse resultado evidencia a baixa visualização internacional, podendo sugerir que o principal motivo para o desinteresse por parte destes pesquisadores, seja o tipo de periódico que esses artigos vêm sendo publicados, pois mesmo a espécie tendo alto potencial econômico comprovado, e ainda ocorrendo em outros países da América do Sul como Venezuela, Bolívia, Peru, Paraguai e Argentina (MANICA, 2002), continua sendo pouco estudada e conhecida pela comunidade científica mundial. Corroborando com esses resultados, foram encontrados apenas dois trabalhos internacionais, consistindo em um de autor norte americano realizado em 1949, e o outro por um autor português em 2011. Esses dados são preocupantes, pois segundo Manica (2002) existe a possibilidade de extinção da espécie, levando a perda do potencial descrito da mangabeira e ainda de outros que poderiam ser descobertos se existisse interesse em âmbito internacional.

Portanto, o objetivo desse estudo cienciométrico foi dar ênfase à situação de baixa produtividade científica sobre a *H. speciosa*, visto que nos últimos 68 anos foram publicados apenas 139 artigos. A maior carência detectada foi na descrição e caracterização morfológica da espécie, seguida de análises moleculares das diferentes variedades, e estudos dos

potenciais farmacológicos da espécie. Existe ainda uma expectativa de contribuir para o surgimento de novos trabalhos, uma vez que muitos temas estudados mostraram uma tendência ao crescimento como o passar dos anos. Um exemplo são os artigos nas áreas de biologia da conservação, ecologia e crescimento da ciência nos países em desenvolvimento (DUARTE, 1999; GRELE et al., 2009; HOLMGREN e SCHNITZER, 2004). Esses resultados poderão moldar os futuros trabalhos a respeito da espécie, além da possibilidade de aumentarem o número de produções em todas as áreas de conhecimento sobre a *H. speciosa*.

Com a finalidade de melhorar esses índices e gerar mais informações a respeito da genética desta espécie, outro objetivo deste trabalho foi gerar marcadores específicos que possam ser úteis para futuros estudos e conservação e melhoramento genético envolvendo *H. speciosa*. Até o momento, existem poucos trabalhos sobre a diversidade genética em populações de mangabeira, e todos estes trabalhos utilizaram como ferramenta molecular os marcadores RAPD (COSTA et al., 2011; MOURA et al., 2011; MOURA et al., 2005; SILVA et al., 2011a). Essa preferência pela técnica de RAPD provém do fato desse marcador ser o comumente usado em estudos nos quais não se tem informação sobre o genoma da espécie. Como mencionado anteriormente, existem apenas seis sequências de DNA de *H. speciosa* depositadas no Banco de dados Genômico National Center for Biotechnology Information (NCBI). Além disso, todos os estudos de *H. speciosa* citados acima foram analisados com amostras de indivíduos localizados em regiões geográficas próximas, ou seja, as áreas de pequena dispersão desta espécie. Nesta análise, por outro lado, as amostras foram coletadas em uma extensa área de dispersão que inclui nove estados brasileiros.

Um dos principais objetivos desse trabalho foi avaliar a taxa de transferência de EST-SSR de *C. roseus* de *H. speciosa*. Para isso usou-se os marcadores EST-SSR descritos por Misha et al. (2011). Foram selecionados os marcadores EST-SSR, por sua fácil disponibilidade, pela grande variabilidade e adequação para análises de alto rendimento, pelo elevado polimorfismo e pela possibilidade de transferência em comparação com outros marcadores disponíveis (THIEL et al., 2003). EST derivados de marcadores microssatélites são mais úteis para o melhoramento genético e análise da diversidade em comparação com os outros marcadores (MISHA et al., 2011). Os resultados dessa pesquisa mostraram que os marcadores EST-SSR apresentaram alta frequência elevada transferibilidade (75%) de *C. roseus* a *H. speciosa*, o que indica outros marcadores microssatélites descritos por Misha et al. (2011) podem ser usados para detectar a variabilidade genética de *H. speciosa*.

No entanto, é importante lembrar que o EST é uma região de DNA altamente conservada existindo uma alta probabilidade de encontrar baixa variabilidade genética entre

espécies estreitamente relacionadas. Os resultados desse trabalho mostraram exatamente essa baixa variabilidade, com a identificação de quatro marcadores monomórficos e cinco marcadores polimórficos com a presença de apenas dois ou três alelos por loco gênico. O baixo valor de heteroziguidade (H_E 0,2) obtido nessa análise, foi semelhante ao obtido por (COSTA et al., 2011) e sugerem que existe uma baixa diversidade genética entre as populações de mangabeira. É importante salientar que os locos polimórficos constituem um indicador importante para a determinação do nível de variação genética (CONTE, 2004). Uma espécie com uma alta taxa de polimorfismo apresenta uma maior capacidade de se adaptar ao ambiente, enquanto que aquelas espécies com baixa taxa de polimorfismo apresentam uma maior chance de serem eliminadas da população por seleção natural.

Em relação à distribuição espacial, o índice de dissimilaridade de Jaccard e distâncias geográficas, indicaram que não houve uma estruturação espacial da variabilidade genética. Essa falta de estruturação pode ser devido ao baixo número de marcadores utilizados e/ou a baixa variabilidade genética detectada pelos marcadores empregados.

Existe uma dificuldade em realizar a classificação taxonômica de *H. speciosa* devido à sua grande diversidade morfológica. Atualmente há uma discussão sobre a classificação e número de variedades botânicas desta espécie. A grande maioria dos taxonomistas ainda utiliza a chave taxonômica desenvolvida por Monachino (1945) para identificar as variedades. De acordo com esse autor, existem seis variedades botânicas de *H. speciosa*: *speciosa*, *gardineri*, *pubescens*, *maximiliani*, *cuyabensis* e *lundii*. No entanto, uma recente reclassificação, realizada por Koch et al. (2014), classifica as variedades de mangabeira em apenas duas variedades (*speciosa* e *pubescens*) e sugere que exista um elevado número de sinonímias no trabalho de Monachino (1945). Um dos objetivos deste trabalho foi comparar a variabilidade genética entre as variedades *H. speciosa* e verificar se existem diferenças significativas entre as variedades botânicas avaliadas. Os resultados obtidos mostraram uma baixa divergência entre as variedades botânicas e uma ausência de locos específicos para os diferentes genótipos. Em conclusão, os marcadores utilizados neste estudo não são capazes de distinguir variedades botânicas para *H. speciosa*.

Nesse trabalho também foi realizada uma análise citogenética entre as variedades botânicas de mangabeira na tentativa de identificar variações cromossômicas que pudessem contribuir na identificação das variedades e caracterização da espécie. Algumas dificuldades metodológicas aliadas à dificuldade em se obter o material biológico resultaram na obtenção de dados inconclusivos, os quais impediram a montagem dos cariótipos das variedades botânicas e análise da variabilidade cromossômica.

CONCLUSÃO

A mangabeira é uma das frutíferas mais ameaçadas de extinção no Cerrado brasileiro e do Nordeste, sendo um resultado da grande redução em sua área de ocorrência nestes ecossistemas, por este motivo um dos objetivos deste estudo foi dar ênfase na situação da produtividade científica sobre a *H. speciosa*, através do levantamento cienciométrico, que demonstrou a necessidade de maior produção científica sobre a espécie, visto que nos últimos 68 anos foram publicados apenas 139 artigos abordando diferentes áreas de conhecimento. Além disso, o resultado obtido pode direcionar futuras pesquisas com a espécie, indicando algumas lacunas que mereçam atenção, entre elas: 1.) descrição, caracterização morfológica, molecular e farmacológica das diferentes variedades da espécie; 2.) maior divulgação dos trabalhos através de publicações internacionais ou em revistas em inglês; e 3.) abrangência de área de estudo.

Já para a possibilidade de transferibilidade dos marcadores moleculares, as informações geradas mostraram que 75% dos marcadores testados foram transferidos da espécie *C. roseus* para a *H. speciosa*, onde quatro marcadores não apresentaram variação entre as populações de mangabeira e cinco marcadores foram polimórficos, apresentando entre dois e três alelos por marcador.

Em relação à distribuição espacial, o índice de dissimilaridade de Jaccard e distâncias geográficas, os resultados indicaram que não houve uma estruturação espacial da variabilidade genética, demonstrando que o número de marcadores moleculares utilizados no estudo, não foram suficientes ou capazes de distinguir de variabilidade genética, bem como as características morfológicas das diferentes variedades de *H. speciosa*. Contudo, os dados gerados poderão ser utilizados no estabelecimento de estratégias de conservação, bem como no direcionamento de cruzamentos em programas de melhoramento, ampliando o conhecimento sobre uma espécie que possui potencial econômico associado à produção de frutos e de fitoterápicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L. M, et al. *Hancornia speciosa* latex for biomedical applications: physical and chemical properties, biocompatibility assessment and angiogenic activity. **Journal of Materials Science**. Materials in Medicine, v. 25, p. 2153-2162, 2014.

ALVARENGA, Samuel Mazzinghy et al. Marcadores moleculares derivados de sequências expressas do genoma café potencialmente envolvidas na resistência à ferrugem. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 46, n. 8, p. 890-898, 2011.

BARBOSA, F. G., SCHNECK, F.; MELO, A. S. Scientometrics of invasive species models. **Braz. J. Biol.** v. 72, n 4, p. 821-829, 2012.

BARROS, I. M. C. **Contribuição ao estudo químico e biológico de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae)**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília.

BASKAR, R.; RAJESWARI, V.; KUMAR, T. S. *In vitro* antioxidant studies in leaves of *Annona species*. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 45, n. 5, p. 480, 2007.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2ª Ed. Viçosa, 2009. 532p.

BORGES FILHO, H. C.; FELFILI, J. M. Avaliação dos níveis de extrativismo da casca de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) no DF, Brasil. **Rev. Árvore**, v. 27, n. 5, p. 735-745, 2003.

BRACK, P.; KINUPP, V. F.; SOBRAL, M. E. G. Levantamento preliminar de espécies frutíferas de árvores e arbustos nativos com uso atual ou potencial no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agroecologia**. Porto Alegre, v. 2, n. 1, p. 1769-1770, 2007.

CAPINAN, G. C. S. **Seleção de germoplasma de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) definidos por marcadores morfológicos e moleculares** / Gean Carlo Soares Capinan - Cruz das Almas - BA, 2007. Dissertação Mestrado.

CARNELOSSI, M. A. G. et al. Physico-chemical quality changes in mangaba (*Hancornia speciosa* gomes) fruit stored at different temperatures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 985-990, 2009.

CARVALHO, I. S. **Potenciais e Limitações do Uso Sustentável da Biodiversidade do Cerrado: um estudo de caso da cooperativa Grande Sertão, no Norte de Minas**. p.165, Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável) Universidade de Brasília, 2007.

CARVALHO, P. C. L. Conservação de germoplasma de frutíferas tropicais com a participação do agricultor. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n 3, p. 730 – 734, 2001.

COHEN, K. O.; SANO, M. Parâmetros físico-químicos dos frutos de mangabeira. **Boletim de pesquisas e desenvolvimento/** Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2010. 11 p.

CONAB. Conjuntura mensal. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_10_10_17_14_06_mangabasetembr02014.pdf, acesso em: 20 de dezembro 2014.

CONTE, R. **Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites.** 2004. 124 f. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz: Piracicaba. 124p, 2004.

COSTA, T. S. Genetic diversity of accessions of the mangaba germplasm bank in Sergipe, Brazil. **Pesq. Agropec. bras.**, Brasília, v. 46, n. 5, p.449-508, 2011.

DE BRITO, E. S. et al. Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1112-1118, 2007.

DE MENEZES, I. P. P. et al. Genetic diversity and structure of natural populations of *Gossypium mustelinum*, a wild relative of cotton, in the basin of the de contas river in Bahia, Brazil. **Genética**, v. 142, n. 1, p. 99-108, 2014.

DOS REIS, R. V. et al. Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro-amarelo detectada por marcadores microssatélites. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 46, n. 1, p. 51-57, 2011.

DUARTE, C. M. Seagrass ecology at the turn of the millennium: challenges for the new century. **Aquatic Botany**, v. 65, n. 1, p. 7-20, 1999.

EMBRAPA CERRADOS. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/>. Acesso em: 07 de outubro 2014.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. de. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. 730p.

FALEIRO, F. G.; **Marcadores genéticos-moleculares aplicados a programas de**

conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102p.

FAN L., et al. Transferability of newly developed Pear SSR markers to other Rosaceae species. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 31: 1271-1282, 2013.

FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 42, p. 369-394, 2006.

FERREIRA HC et al. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidyl-inositol 3-kinase. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p.161164, 2007.

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

FERREIRA M. E.; GRATTAPAGLIA D. **Introdução de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análise genética.** EMBRAPA-CENARGEN 220p., 1995.

GOMES FILHO A. Marcadores moleculares RAPD e descritores morfológicos na avaliação da diversidade genética de goiabeiras (*Psidium guajava* L.) **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 627-633, 2010.

GONZÁLEZ-PÉREZ M. A., et al. Molecular markers reveal no genetic differentiation between *Myrica rivas-martinezii* and *M. faya* (Myricaceae). **Ann. Bot.** 103(1), 79-86, 2009.

GRELLE, C. E. V. et al. Uma década de Biologia da Conservação no Brasil. **Oecologia Australis**, v. 13, n. 3, p. 420-433, 2009.

GUARIM NETO, G. **Plantas utilizadas na medicina popular do estado de Mato Grosso.** Ministério da Ciência e Tecnologia, p.58, 1997.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. de. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana.** Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002.

HOLMGREN, M.; SCHNITZER, S. A. Science on the rise in developing countries. **PLoS Biology**, v. 2, n. 1, p. e1, 2004.

HOUWES, D. S. **Indicadores de Ciência do estado de Santa Catarina a partir de dados da Web of Science** / Daniele Houwes Silveira. – Florianópolis, 2012. 58f.

IBAMA. Ecosistemas Brasileiros: Cerrado: Disponível em: http://siscom.ibama.gov.br/monitorabiomas/cerrado/RELATORIO%20FINAL_CERRADO_2010.pdf, acesso em: 09 de março 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE ESTATÍSTICA (IBGE) Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 10 de outubro de 2014.

JUNQUEIRA, K. P. et al. Variabilidade genética de acessos de pitaya com diferentes níveis de produção por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 3, p. 840-846, 2010.

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

KOCH I. et al. (2014). Apocynaceae in lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at: [<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15558>]. Accessed: 2014 Out 31.

LAL, S. et al. Genetic diversity among five economically important species of asparagus collected from central gujarat (India) utilizing RAPD markers (Random Amplification of Polymorphic DNA). **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 2, p 414-421, 2011.

LAURINDO, R.; MAFRA, T. Cienciometria da revista Comunicação & Sociedade identifica interfaces da área, **Comunicação & Sociedade**, n. 53, p. 233-260, 2010.

LEDERMAN, I. E; BEZERRA, J. E. F. Situação atual e perspectivas da cultura de mangaba no Brasil. **In: Simpósio Brasileiro sobre a cultura da Mangaba. Anais**, Aracajú, 2003.

LEDERMAN, I. E., et al. **Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes)**. FUNEP, Jaboticabal, 2000.

LIMA, I. L. P. **Etnobotânica quantitativa de plantas do Cerrado e extrativismo de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) no Norte de Minas Gerais: implicações para o manejo sustentável**. Brasília, Universidade de Brasília, 106 p. 2008. Dissertação de Mestrado.

MACIAS-CHAPULA, C. A. O papel da informetria e da cienciometria e sua perspectiva nacional e internacional. **Ci. Inf.**, v. 27, n. 2, p. 134-140, 1998.

MATHITHUMILAN B., et al. Development and characterization of microsatellite markers for *Morus* spp. and assessment of their transferability to other closely related species. **BMC plant biology**, v. 13, n. 1, p. 194, 2013.

MANICA, I. Frutas nativas, silvestres e exóticas 2: técnicas de produção de mercado: jeijoa, figo-da-índia, fruta pão, jaca, lichia, mangaba Ivo Manica. **Porto Alegre: Cinco Continentes**, p. 459-541, 2002.

MARINHO D. G et al. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 135, p. 530-537, 2011.

MÉNAN, H. et al. Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plants used in West African traditional medicine for the treatment of malaria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1, p. 131-136, 2006.

MESQUITA-NETO, J. N.; SOUZA, F. L. Etnoecologia de plantas medicinais: uma compilação de dados do cerrado Goiano. In: **Anais... IX Congresso de Ecologia do Brasil, São Lourenço, MG. 2009.**

MIRANDA – VILELA, A. L. **Avaliação dos efeitos antígenotóxicos, antioxidantes e farmacológicos de extratos da polpa do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* CAMB.)** Tese de doutorado. Universidade de Brasília, DF, 2009. Pág 07-132.

MISHRA R. K. et al. Development and characterization EST based SSR markers in Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*) **Plant Omics Journal**, v. 4, n 3, p. 154-162, 2011.

MNEJJA, M et al. Prunus microsatellite marker transferability across rosaceous crops. **Tree Genetics & Genomes**, v.6, n.5, p.689-700, 2010.

Ministério do Meio Ambiente (MMA) Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf_chm_rbbio/_arquivos/relatoriofinal_cerrado_2010_final_72_1.pdf, acessado em: 05 de março 2015.

Ministério do Meio Ambiente (MMA) Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>, acessado em: 05 de março 2015.

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

MORAES, T. M. et al. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 120, p. 161-168, 2008.

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

MOURA, N. F. et al. Genetic structure of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) populations in the Cerrado region of Central Brazil. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 27, n. 3, p. 473-481, 2011.

MOURA, N. F. et al. Selection of RAPD markers to study genetic structure of *Hancornia speciosa* Gomes. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 21, n. 3, p. 119-125, 2005.

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

MOURA, C. F. H. Quality of fruits native to Latin America for processing: mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). **Acta Horticulture**, Leuven, v2, n.575, p. 549-554, 2002.

MÜLLER, G. A.; MARCONDES, C. B.; NAVARRO-SILVA, M. A. Aplicação de marcadores microssatélites para o estudo de *Culicidae* (Diptera): revisão com especial referência a *Haemagogus*. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, v. 50, p. 175-186, 2010.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>. Acesso em 10 de janeiro de 2014.

NAKATANI, A. K.; LOPES, R.; CAMARGO, L. E. A. Variabilidade genética de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 2, p. 116-120, 2009.

OSORIO, E. et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of *Colombian Annonaceae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 630-635, 2007.

PAIVA, C. L. **Descritores morfológicos e marcadores microssatélites na caracterização de**

germoplasma de passiflora spp. /Claudia Lougon Paiva. CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ ABRIL – 2013. Dissertação Mestrado.

PAN H. et al. DNA extraction of birch leaves by improved CTAB method and optimization of its ISSR system. **J. For. Res**, v. 4, p. 298–300, 2006.

PEAKALL R.; SMOSSE P. E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. **Bioinformatics**, v. 28, p.2537–2539, 2012.

PEDROSA, A. et al. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco. **Acta Bot. Bras.** v. 13, n.1, p. 49-60, 1999.

PEREIRA, J. V. et al. In vitro antimicrobial activity of an extract from *Anacardium occidentale* Linn. on *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. **Odontol. Clín. Cient**, v. 5, n. 2, p. 137-141, 2006.

PERRIER X.; JACQUEMOUD-COLLET J. P. (2006) DARwin software. Available at. <http://darwin.cirad.fr/>. Acesso em 23 de fevereiro de 2013.

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

REZENDE, C. F. A et al. Caracterização de ambientes com alta densidade e ocorrência natural de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) no Cerrado. In: Simpósio Brasileiro sobre a cultura da mangaba, **Anais**, Aracaju, SE, 2003. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. Disponível em CD-ROM.

RIGONATO, V. D.; ALMEIDA, M. G. A singularidade do Cerrado: a interrelação das populações tradicionais com as fitofisionomias. **EREGEO: Encontro Regional de Geografia: a geografia no mundo da diversidade**, v. 8, 2003.

SALLA, M. F. S. et al. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* DC). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 15-22, 2002.

SAMPAIO, R. B. et al. Rabbit retinal neovascularization induced by latex angiogenic-derived fraction: an experimental model. **Current Eye Research**, v. 35, n. 1, p. 56-62, 2010.

SAMPAIO, T. S. **Estudo Fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes: isolamento, determinação estrutural e atividade biológica.** São Cristóvão, SE, 2008. Dissertação

Mestrado.

SANTOS, P. O. et al. Investigação da atividade antimicrobiana do látex da mangabeira (*Hancornia speciosa* GOMES). **Rev Bras Pl Med**, v. 9, p. 108-111, 2007.

SANTOS, R. N. M. dos. Produção científica: por que medir? o que medir?. **Revista digital de Biblioteconomia e Ciência da Informação**, v. 1, n. 1, 2003.

SIGRIST, Mário Sérgio. **Divergência genética em *Curcuma longa* L. utilizando marcadores microssatélites e agromorfológicos**. 2009. Tese de Doutorado. São Paulo (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Instituto Agrônômico (IAC).

SILVA, S. A. et al. Morphological and molecular characterization of mangaba genotypes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 4, p. 1093-1100, 2013.

SILVA, C. G. et al. *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 137, p. 709-711, 2011a.

SILVA, A. V. C. et al. Genetic diversity between *Hancornia speciosa* Gomes varieties. **Rev. Bras. Ciênc. Agrár.**, Recife, v.6, n.4, p. 572-578, 2011b.

SILVA, C. S. P.; PROENÇA, C. E. B. Flora medicinal nativa do bioma cerrado catalogada por estudos etnobotânicos. **Revista Anhanguera** v.8 n.1. p.67-88, 2007.

SILVA, J. T. **Caracterização citogenética de espécies e variedades de bambu com potencial econômico no Nordeste brasileiro**. Recife-PE. 2007. Dissertação de Mestrado.

SILVA JÚNIOR, J. F. Recursos genéticos da mangabeira nos tabuleiros Costeiros e baixadas Litoranêas do Nordeste do Brasil. In: SIMPOSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 2003, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa tabuleiros Costeiros, 2003. CD-ROM.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. et al. **Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification**. 1973.

SOARES, F. P. et al. Cultura da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Boletim Agropecuário** - Universidade Federal de Lavras, Lavras, n. 67, p. 1-12, 2005.

SONG S.L., et al. Development of chloroplast simple sequence repeat (cpSSR) for the intraspecific study of *Gracilaria tenuistipitata* (*Gracilariales*, *Rhodophyta*) from different populations. **BMC Research Notes**, 2014.

SOUZA, S. A. M. **Caracterização Citogenética, química e molecular em *Capsicum chinense* Jacq.** / Sergio Alessandro Machado Souza – 2008. 66f. :if.

SOUSA, C. S. et al. Mangaba. **Bahia agrícola**, v. 7, n. 1-3, 2005.

SOUZA, V. A. B de; ARAÚJO, E. C. E.; VASCONCELOS, L. F. L. Perspectivas do melhoramento de espécies nativas do nordeste brasileiro. In: **Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. Goiânia: Embrapa-CNPAP/SBMP, 2001.

TAMURA K. et al. Mega5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parcimony methods. **Mol Biol and Evol** 28: 2731-2739, 2011.

THIEL, T. et al. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, n. 3, p. 411-422, 2003.

VANTI, N. A. P.; Da bibliometria à webometria: uma exploração conceitual dos mecanismos utilizados para medir o registro da informação e a difusão do conhecimento. **Ci. Inf.**, v. 31, n. 2, p. 152-162, 2002.

VIEIRA NETO, R. D. et al. Caracterização do sistema produtivo da mangabeira no município de Itaporanga D'Ajuda, Sergipe. **Embrapa Tabuleiros Costeiros. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2009.

WANG B. H., et al. Development of EST-SSR markers related to salt tolerance and their amplification in genetic diversity and evolution analysis in *Gossypium*. **Genetics and Molecular Research**.13(2), 3732-3746, 2014.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR/** Maria Imaculada Zucchi, Piracicaba, 2002, 130 p. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ANEXOS

***Artigo a ser submetido para publicação no periódico *Genetics and Molecular Research* (ISSN: 1676-5680; Fator de impacto: 0,85).**

Intraspecific differentiation of *Hancornia speciosa* revealed by SSR and RAPD markers

Running title: Genetic variability of *H. speciosa*

CA Nogueira¹, NB Stafuzza², TP Ribeiro³, ADL do Prado³, IPP. Menezes⁴, N Peixoto³, PJ Gonçalves⁵ and LM de Almeida¹.

¹ Universidade Estadual de Goiás – Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas, GO, Brasil.

² Departamento de Ciências Exatas, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Universidade Estadual de São Paulo “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP-FCAV, Jaboticabal, Brasil.

³ Universidade Estadual de Goiás – Campus Ipameri, GO, Brasil.

⁴ Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Instituto Federal Goiano, Urutaí, GO, Brasil.

⁵ Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia, Brasil.

***Corresponding author:** Luciane Madureira de Almeida, Universidade Estadual de Goiás, Rodovia BR 153, nº 3105, Fazenda Barreiro do Meio – Campus Henrique Santillo-Anápolis, Caixa Postal 459; CEP: 75.132-400, Brasil. Tel: 55 62 3328115; Fax: 55 62 33281177.

E-mail: almeidalm@hotmail.com

ABSTRACT

Hancornia speciosa, popularly known as “mangabeira”, is a native fruit tree of the Brazilian Cerrado that show great economic potential due of its multiple uses. Intraspecific classification of this species is difficult due its high morphological diversity. According Monachino (1945), there are six botanic varieties which differ morphologically mainly through leaf and flower. Beside the wide morphological variation and economic potential few studies have been published about the genetic diversity of mangabeira. Knowledge of how the genetic variability of this species is organized among populations would be useful for genetic conservation and breeding programs. We tested the transferability of 12 simple sequence repeat (EST-SSR) from *C. roseus* to *H. speciosa* and also used 10 random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to evaluate the genetic variability among botanical varieties of *H. speciosa*. As result we obtained a high transferability frequency of EST-SSR markers from *C. roseus* to *H. speciosa* (75%). However, EST-SSR markers showed low heterozygosity (*He*) and locus variability (two or three alleles by locus), which suggest low genetic diversity to mangaba samples. In relation to the spatial distribution, Jaccard dissimilarity index and geographic distances, indicated a non-space structuring of the variability. In relation to the botanical taxonomy, our markers are not able to distinguish *H. speciosa* botanical varieties.

Keywords: Cerrado; Genetic variability; Mangabeira; Molecular markers Native fruit tree; Transferability.

INTRODUCTION

Hancornia speciosa Gomes, commonly known as “mangabeira”, is a plant species found in “Cerrado”, the Brazilian savanna-like vegetation. The interest in the mangabeira culture has been growing in the last years, with the fruit as the main commercial product. Besides the fruits, other products from mangabeira have shown commercial value or at least potential. For example, the extract obtained from the leaves can have a hypotensive effect (Ferreira et al., 2007ab; Silva et al., 2011). Different flavonoids, catechins, anthocyanins and tannins extracted from the bark can be used to treat gastritis caused by *Helicobacter pylori* (Moraes et al., 2008) or to stimulate liver functions, diabetes, hypertension and dermatitis (Macedo and Ferreira, 2004; Ritter et al., 2002). Recently, the latex from this species was shown anti-inflammatory (Marinho et al., 2011) and angiogenic activities (Almeida et al., 2014).

Despite its pharmacological and economic potentials there are few commercial plantations in Brazil and the most fruit production is based on extractive activity (Carvalho et al., 2001). Add to the extractive activity, the *H. speciosa* occurrence in the Brazilian cerrado have been affected by expanding agricultural frontiers (WWF, 2011), which may reduce the genetic variability by founder or bottleneck effects (Young et al., 1996). Then, genetic conservation programs are necessary to maintain the diversity of this species.

Regarding its botanical classification, mangabeira belongs to Dicotyledoneae class, Gentianales order, Apocynaceae family, *Hancornia* genus with only one monophyletic species *Hancornia speciosa*. According Monachino (1945) there are six botanical varieties which differ one from another mainly by leaf and flower shape: *Hancornia* variety *speciosa speciosa*, *maximilliani*, *lundii*, *cuyabensis*, *gardneri* and *pubescens*. Since the classification of these varieties is performed exclusively by morphological characteristics, there is a great difficulty in identifying different strains and many times doubts in the classification system (Moura, 2003).

The success of any breeding or genetic conservation program is dependent on an understanding of amount and distribution of genetic variation present in the species genome. Traditionally, a combination of morphological and agronomic traits has been used to measure genetic diversity. However, *H. speciosa* is a heterogeneous plant with many overlapping morphological attributes. In addition, many vegetative characteristics are influenced by environment factors and show a continuous variation and high plasticity, which difficult to identify discrete taxonomic groups. In an attempt to overcome these problems

molecular markers have been commonly employed to monitor the genetic variability (Song et al., 2014; de Menezes et al., 2014; Gonzalés-Pérez et al., 2009).

Microsatellite markers (SSR) have been widely used as a tool to answer several questions on population genetics (Gonzalés-Pérez et al., 2009; Wang et al., 2014; Madesis et al., 2014). However, advances in the use of microsatellites have been hindered due to high cost and time taken to develop specific primers for each locus of the native species (Zucchi et al., 2003). Many studies have shown the possibility of using primers designed for one species to other species belonging to the same genus or even among different genera in the process called transferability (Fan et al., 2013; Mathithumilan et al., 2013). An interesting marker to be used between species of different genera is the EST-SSR. The expressed sequence tags (ESTs) provides a source of PCR-based markers to SSR direction (Wang et al., 2014). In the present study we evaluate the transferability of EST-SSR markers described to *Catharanthus roseus* to *H. speciosa*. *C. roseus* belongs to the same family as mangabeira and there is a study showing the transferability from EST-SSR markers of *C. roseus* to others medicinal plants (Mishra et al., 2011).

Other type of molecular marker selected by this study was the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) that is a good option for species that do not have genetic characterization. Search in database showed that there are only six DNA sequences of *H. speciosa* deposited at Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Also, RAPD markers have advantage of to require lower level of skill, low cost per assay, and the ready availability of primers allow the scanning of the entire genome and genotype characterization (Li et al., 2012).

The main objective of this research was the generation of information for future conservation, domestication and breeding studies of mangaba. For that it was evaluated: 1. the transferability of microsatellite markers of *C. roseus* to *H. speciosa*; 2. estimate the genetic diversity of the species and determine if genetic variation is related to geographical distribution; and 3. estimate the genetic relationship among different botanical varieties of *H. speciosa*.

MATERIAL AND METODHS

Plant Material

Thirty-four samples were collected in 27 locations in Brazilian Cerrado covering nine states (Figure 1). The leaves were collected and transported to laboratory for lineage identification

and DNA extraction. DNA from young leaves was extracted using a modified cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) procedure (Pan et al., 2006). DNA concentration and quality was estimated electrophoretically and spectrophotometrically by Nanodrop (Thermo Scientific).

Oligonucleotides primers

A total of 12 simple sequence repeats from *Catharanthus roseus* (Table 1) were tested in our experiments with mangabeira DNA. The primers sequences were developed by Mishra et al. (2011). For RAPD experiments were tested four oligonucleotides primers previously used by Silva et al. (2011) in mangabeira and six oligonucleotides primers used by Lal et al. (2011) (Table1).

Polymerase chain reaction (PCR)

PCR reactions were performed in a MJ Research PTC-200 thermocycler with thermal gradient software to select the best annealing temperature for each marker. For EST-SSR experiments PCR mixtures included: 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM dNTPs, 0.2 mM each primer, 0.5 unit of AmpliTaq Gold polymerase (Life Technologies™) and 50 ng DNA in a 10 µl reactions volume. The PCR conditions were as follows: initial denaturation at 94°C for 10 min, followed by 35 cycles at 94°C for 30 sec (denaturation), 50 to 65°C for 30 sec (annealing depending on the individual microsatellite marker, Table 1), extension at 72°C for 30 sec and a final extension at 72°C for 7 min. For RAPD experiments we used the same PCR conditions, except 0.5 unit of Taq Polimerase (Thermo Scientific). The PCR conditions were as follows: initial denaturation at 94°C for 1 min, followed by 35 cycles at 94°C for 30 sec (denaturation), 40 to 42°C for 30 sec (annealing depending on the individual microsatellite marker, Table1), extension at 72°C for 30 sec and a final extension at 72°C for 7 min.

The PCR products were electrophoresed through 3% agarose gels in 1X TBE buffer containing ethidium bromide and photographed under UV light. PCR products were scored as 1 for present and 0 for absent amplification and the data entered into a binary matrix as discrete variables.

Data analysis

The SSR and RAPD products were scored as “1” for present and “0” for absent. The number of amplified fragments, polymorphic fragments and percentage of polymorphism were obtained. Genetic diversity across 34 samples was calculated using GENALEX 6.5 program (Peakall and Smouse 2012). The data matrix to the markers in joint was used to calculate dissimilarity matrix using the Jaccard coefficient according to the method of Sneath and Sokal (1973) using DARWIN V5.0 program (Perrier and Jacquemoud-Collet, 2006). We determine the genetic relationships across 34 samples using a dendrogram based unweighted pair group method of averages (UPGMA) with the MEGA5 program (Tamura et al., 2011). The cophenetic correlation also was measured to evaluate the degree of fit of the clusters in the dendrogram to the data in the dissimilarity coefficient matrix. To help in the clustering analysis also was realized principal component analysis (PCA) to all genotypes.

RESULTS

Morphological classification

It was collected five from six morphological lineages of *Hancornia speciosa* through nine states and the samples were identified according Monachino (1945). We identified as *H. speciosa speciosa* the samples with glabrous leaves, petioles 0.9 to 0.15 cm in length and leaf lamina of up to 6 cm long and 2 cm wide. This botanical variety was collected in Natal (RN), Aracajú (SE), Morro de São Paulo (BA), Trancoso (BA), and Ilhéus (BA). We identified as *H. speciosa gardineri* the samples with glabrous leaves, petioles from 0.3 to 0.5 cm in length and leaf blade 6 to 12 cm long and 3 to 6 cm wide. This botanical variety was collected in Guapó (GO), Cidade de Goiás (GO), Quirinópolis (GO), Rio Quente (GO), Campo Alegre (GO), Ipameri (GO), Silvânia (GO), Heitorai (GO), Catalão (GO), Pires do Rio (GO), Minaçu (GO), Pirinópolis (GO), Anápolis (GO), Porangatu (GO) and Ilha Solteira (SP). We identified as *H. speciosa pubescens* the samples with short petioles, pubescent blade at the bottom, with 6 to 12 cm in length and 3 to 6 cm wide. This botanical variety was collected in Balsas (MA), Gameleira (GO) and Ipameri (GO). We identified as *H. speciosa maximiliani* the samples with glabrous leaves, petiole about 0.8 cm in length, limb of 5 to 6 cm in length and 2 to 2.5 cm wide. This botanical variety was collected in Prata (MG) and Araguari (MG). We identified as *H. speciosa cuyabensis* the samples with petiole between 0.3 to 0.5 cm in length, limb 4 to 10 cm long and 1.5 to 3 cm wide, calyx and corolla glabrous externally. This

botanical variety was collected in Monte Alegre (MG). We identified as *H. speciosa lundii* the samples with petiole with 0.3 to 0.5 cm long, limbo with 5 to 7 cm long and 3 cm wide and pedicels pubescent. This botanical variety was collected in Nova Xavantina (MT) and Cassilândia (MS). Some samples were deposited at the State University of Goiás Herbarium (Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, Goiás, Brazil).

Transferability of microsatellite markers of *C. roseus* to *H. speciosa*

The 12 primers tested were classified according to the quality obtained in the PCR: 75% (nine pairs of primers) amplified clear EST-SSR products, 16.7% presented nonspecific fragments amplification and 8.3% did not amplify any fragment. From the nine primers pairs that showed amplification, four were monomorphic and five polymorphic. The total number of alleles identified was 14, with a range from two to three bands per locus. Table 2 showed the genetic characterization of five microsatellite loci in 34 mangabeira samples. While there is relative excess ($F_{IS} < 0$) or disability ($F_{IS} > 0$) for some of the heterozygous loci studied, the average genetic diversity ($H_E = 0.226 \pm 0.017$) does not differ significantly from the observed heterozygosity ($H_O = 0.194, \pm 0.0039$), when considering the standard error of the mean. Thus, indicating the absence of a standard or intra interloco distribution, as indicated by an average rate of inbreeding is not different from zero ($F_{IS} = 0.119 \pm 0.157$).

Estimate the genetic diversity of the species and association with geographical distribution of *H. speciosa*

Analysis on the Jaccard dissimilarity coefficients, calculated based on the presence and absence of RAPD and EST-SSR markers, showed that the similarity coefficients were highly similar, indicating a high degree of association between the dendrogram cluster and dissimilarity matrices. Based on this result, we decided to use both markers to estimate the genetic diversity. The average dissimilarity obtained was 0.80; whereas the observed maximum dissimilarity was 1.0 and the minimum was 0.34. Analysis between genetic dissimilarity and geographic distance of *H. speciosa* from different regions was positively correlated but not significant (correlation coefficient, $r = 0.17$). Genetic cluster analysis was conducted using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA). Cluster analysis divided the 34 genotype studied into six main groups (Figure 2). There was not a correlation between genetic diversity and geographical distribution, since lineages collected

from distant regions were grouped, for example: samples from Bahia (Morro SP 1) and São Paulo (Ilha Solteira) were grouped with different samples from Goiás; samples from Maranhão (Balsas), Rio Grande do Norte (Natal), Goiás (Guapó) were grouped with Minas Gerais (Monte Alegre); samples from Mato Grosso (Nova Xavantina) was grouped with Bahia (Morro SP2); samples from Sergipe (Aracaju), Goiás (Pires do Rio) and Bahia (Trancoso) were grouped with Minas Gerais (Prata). This result suggested a non-space structuring of the variability for the different lineages of *H. speciosa*.

Assess the genetic relationship between different *H. speciosa* varieties

Analysis of molecular variance (AMOVA) and principal component analysis (PCA) were performed to evaluate the genetic variability among the botanical varieties. The molecular variance between the botanical varieties was not significant (0.03) and the PCA not detected a differentiation between the botanical varieties. The results are showed in Figure 3. In this way, the markers employed in this study are not able to distinguish variation as well as the morphological traits.

DISCUSSION

The objective of this article was generating specific markers which can be useful for future conservation and genetic improvement studies involving *H. speciosa*. Up to now, there are very few works about genetic diversity on mangaba populations, and all of them use RAPD markers as molecular tool (Silva et al., 2011; Costa et al., 2011; Moura et al., 2011; Moura et al., 2005) due the absence of the specie genome information. As mentioned before there are only six sequences of *H. speciosa* deposited at Genbank database. In addition, all studies of *H. speciosa* cited before based their analysis in regional or local samples evaluating only smaller dispersion areas of this specie. Our analysis, on the other hand, takes care in use samples collected in an extent dispersion area which includes nine Brazilian states. One of our objectives was transfer SSR markers from *C. roseus* to *H. speciosa*. For that we used the EST-SSR markers described by Misha et al., 2011. We selected those EST-SSR markers due their easy availability, hyper variability and suitability for high throughput analysis, high polymorphism and transferability in comparison to other/available markers. EST derived SSR markers are more useful for genetic improvement and diversity analysis in comparison to the others markers (Misha et al., 2011). Our EST-SSR results showed a high transferability

frequency (75%) of *C. roseus* to *H. speciosa*, which indicates others SSR markers described by Misha et al. (2011) can be useful to detect the genetic variability of *H. speciosa*. However, it is important to remember that the EST is a DNA region highly conserved and there is a high probability of finding low genetic variability among closely related species. Our results showed exactly this low locus variability, with four monomorphic markers and five markers with two or three alleles by locus. The low *He* value (0.2) obtained in our analysis is similar to other study (Costa et al., 2011) and suggested low genetic diversity to mangabeira populations. The polymorphic loci are an important indicator for determining the level of genetic variation of a given area. A specimen with a high polymorphic locus rate showed a stronger capability for adaptation to environment, whereas those with a weaker capability would be eliminated by natural selection.

In relation to the spatial distribution, Jaccard dissimilarity index and geographic distances, indicating a non-space structuring of the variability. This probably is due to the low number of markers used and the low genetic variability detected for the markers employed.

The taxonomy of *H. speciosa* is confused in many cases due to its great morphological diversity. Currently there is a discussion about the classification of this species. The most taxonomists still use the Monachino (1945) classification, which identified six lineages for *H. speciosa* (*speciosa*, *gardineri*, *pubescens*, *maximiliani*, *cuyabenssis*, and *lundii*). However, a recent reclassification (Koch et al., 2014) suggested a high number of synonymies and the classification in only two lineages (*speciosa* and *pubescens*). One main goal of this work was to compare the genetic variability between the *H. speciosa* lineages and verify if there is a significant difference in the botanical varieties evaluated. As a result we observed a low divergence between the botanical varieties and an absence of specific fragments for different genotypes. In conclusion, the markers used in this study are not able to distinguish botanical varieties for *H. speciosa*.

The mangabeira is one of the most fruitful threatened with extinction in the Brazilian Cerrado and the Northeast, it is a result of the large reduction in its area of occurrence. The reduction is mainly due to deforestation, land speculation and expansion of the agricultural frontier for grain crops and pastures (Lederman et al., 2000). Thus, it is necessary to study that characterize the distribution and the genetic composition of the different populations. This characterization is fundamental to outline conservation and breeding projects. This paper's contribution was to identify reliable molecular markers to be used in future research, and showed the low genetic variability between botanical varieties of *H. speciosa*.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the Brazilian funding agencies MCT/CNPq, FNDCT, CAPES, FINEP, FAPEG and FUNAPEP. The authors also acknowledge the Universidade Estadual de Goiás (UEG) for student scholarship and technological support.

LEGENDS

Figure 1: *H. speciosa* geographic distribution in the Brazilian Cerrado biome (in green) and locations where the samples used in this study were collected.

Figure 2: Genetic distance dendrogram for regions of *H. speciosa* using SSR and RAPD markers.

Figure 3. Genetic relationship between botanical varieties of *H. speciosa* using PCA analysis.

Table 1. EST-SSR and RAPD primers sequence used for *H. speciosa* DNA amplification.

Table 2. Genetic characterization of 5 microsatellite loci in 34 *H. speciosa* samples.

Figure 1: *H. speciosa* geographic distribution in the Brazilian Cerrado biome (in green) and locations where the samples used in this study were collected.

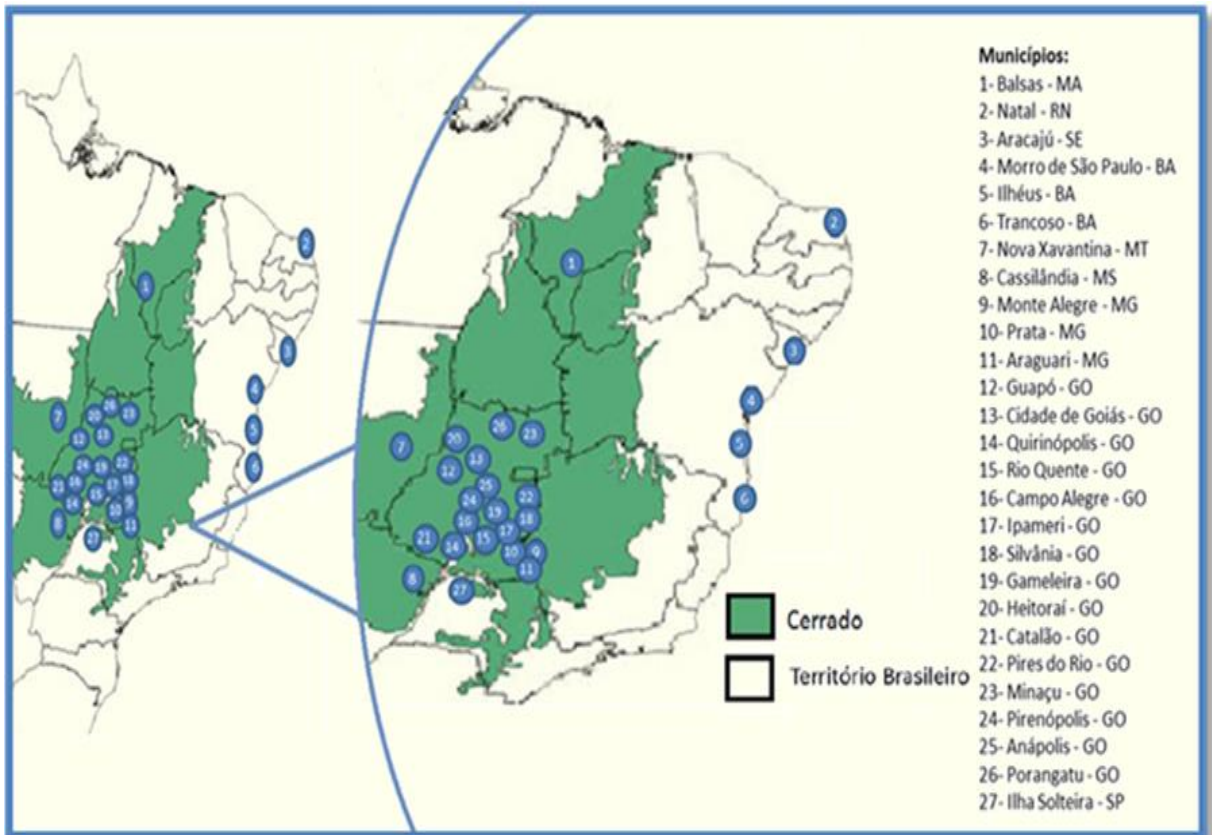


Table 1. EST-SSR and RAPD primers sequence used for *H. speciosa* DNA amplification.

Marker	ID	Sequence	Annealing temperature (°C)	Reference
SSR-RG01	gij164561865	F:GGAACCAAGGATGTTAGAGTGG R:CTGCAACGGTTACTAGAGAGTAGAGC	50	Mishra et al., 2011
SSR-RG04	gij164556897	F: CGTCAAGACCTACCCAGGAG R: GTCTCTCCGTCACCAGAAA	50	Mishra et al., 2011
SSR-RG05	gij164556756	F: CTGCTAGGCATGGTGGTGTAG R: GATCCCAGCGGTGACTCTTA	56	Mishra et al., 2011
SSR-RG07	gij164556449	F: GAGGAGGTGCTCTCATGCTG R: CGACCTCAACAGAAGGTTTCG	50	Mishra et al., 2011
SSR-RG08	gij164555839	F: AGAAGGAAGTGGTGGTGTCTG R: GTTTACAGGGGGAGGAGGAG	56	Mishra et al., 2011
SSR-RG11	gij164561349	F: GGCACGAGGCATCCTTACTC R: CCACAGCTCTGGTAGCTCCT	56	Mishra et al., 2011
SSR-RG12	gij164561153	F: GGACAAGCTGGAGCAGCA R: CTGCAACCAGAGGCTTCC	50	Mishra et al., 2011
SSR-RG13	gij164560959	F: CCGGAGGTGATGAGGTTCTG R: GAGGCTGCTTTGGAGGAG	56	Mishra et al., 2011
SSR-RG15	gij164556819	F: GAGAGAGAGAGAGCGGCAAG R: GTGGGTCTCCACAATAGCG	60	Mishra et al., 2011
SSR-RG18	gij164561715	F: CATCTCTTCTCGAGGCTTCTG R: ACCCCCATGACAGTCAAGATAG	53	Mishra et al., 2011
SSR-RG21	gij164559832	F: CCCTTCCTGAGAGACTCAAATG R: CCAAGCACTCTTCATCTCAGG	53	Mishra et al., 2011
SSR-RG30	gij164554493	F: GCCTCCAGTTACCCTTCCTC R: ACAGCAGGATCACCAAGACC	53	Mishra et al., 2011
RAPD-ITD04	-	TGATCCCTGG	37	Silva et al., 2011
RAPD-ITD11	-	ACGGATCCTG	37	Silva et al., 2011
RAPD-ITD13	-	CTACGGAGGA	37	Silva et al., 2011
RAPD-ITD14	-	GGCACTGAGG	37	Silva et al., 2011
RAPD-OPA03	-	AGTCAGCCAC	42	Lal et al., 2011
RAPD-OPC12	-	TGTCATCCCC	42	Lal et al., 2011
RAPD-OPD20	-	AACCCGGTCA	42	
RAPD-OPN15	-	CAGCGACTGT	42	Lal et al., 2011
RAPD-OPAF5	-	CCCGATCAGA	42	Lal et al., 2011
RAPD-OPAF15	-	CACGAACCTC	42	Lal et al., 2011
RAPD-ITD13/ITD11	-	CTACGGAGGA ACGGATCCTG	42	Silva et al., 2011
RAPD-ITD13/ITD14	-	CTACGGAGGA GGCACTGAGG	42	Silva et al., 2011
RAPD-ITD4/ITD11	-	TGATCCCTGG ACGGATCCTG	42	Silva et al., 2011
RAPD- OPA03/ OPAF5	-	AGTCAGCCAC CCCGATCAGA	42	Lal et al., 2011

Table 2. Genetic characterization of five microsatellite loci in 34 *H. speciosa* samples.

Locus	Aleles (bp)	A	H_O	H_E	F_{IS}
RG07	159, 177, 193	3	0.095	0.260	0.625
RG08	63, 75, 99	3	0.273	0.255	-0.119
RG12	113, 177, 195	3	0.107	0.168	0.351
RG21	193, 313	2	0.273	0.241	-0.158
RG30	326, 447, 603	3	0.222	0.205	-0.106
Total		14	0.194	0.226	0.119
Stand Erro		-	0.039	0.017	0.157

A: number of alleles; H_O: observed heterozygosity; H_E: expected heterozygosity; F_{IS}: inbreeding coefficient

Figure 2: Genetic distance dendrogram for regions of *H. speciosa* using SSR and RAPD markers.

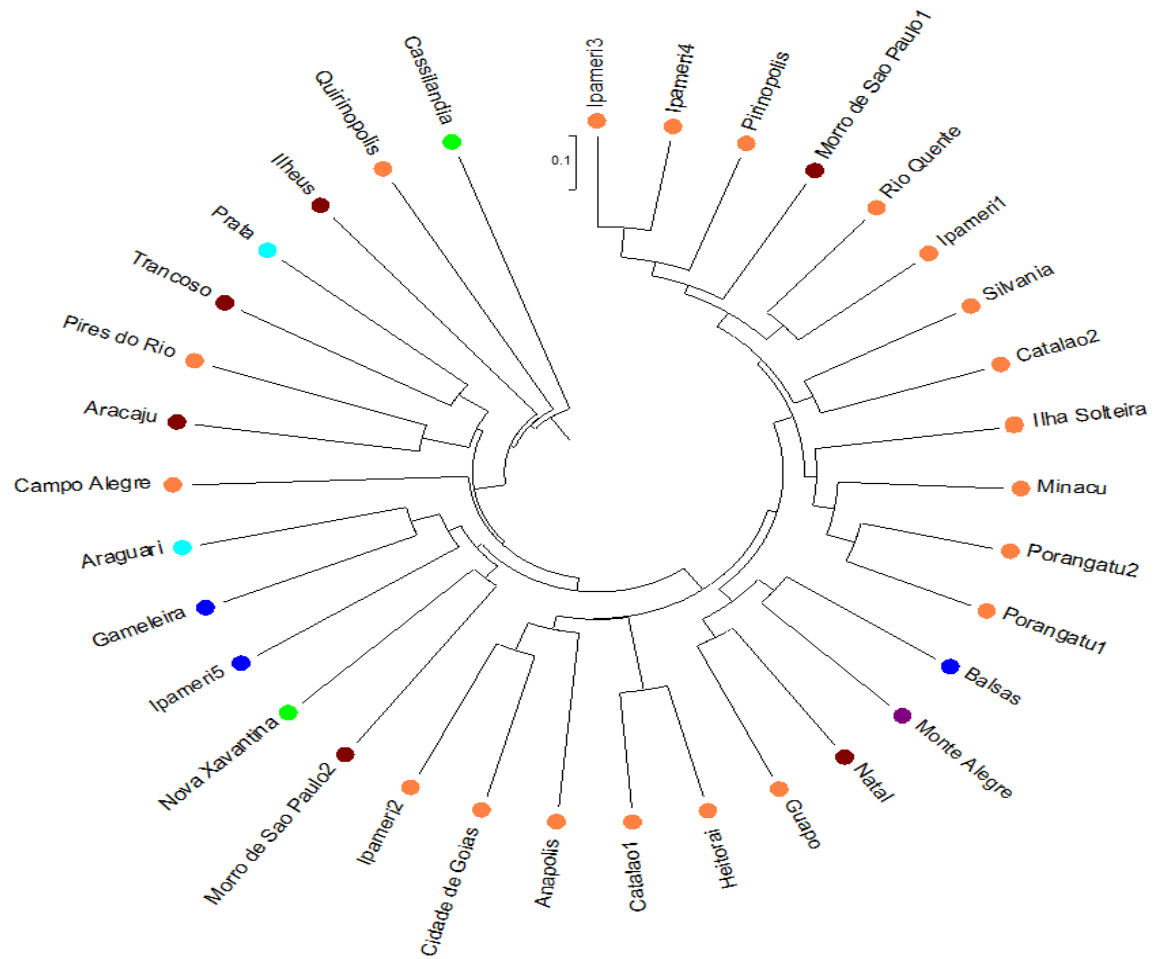
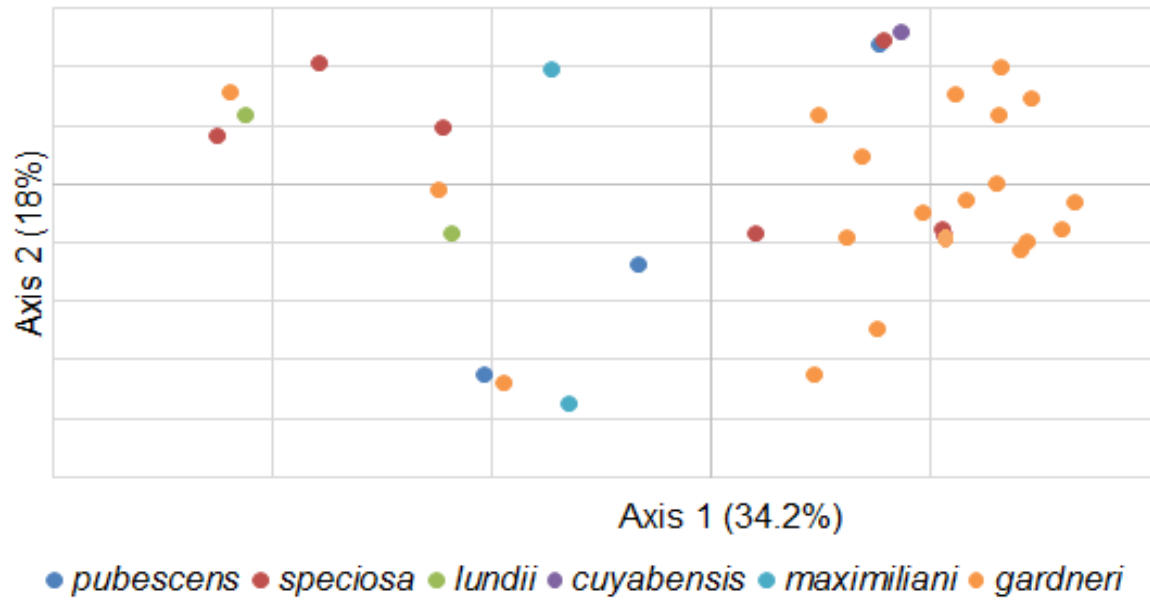


Figure 3. Genetic relationship between botanical varieties of *H. speciosa* using PCA analysis.



REFERENCES

- Almeida LM, Floriano JF, Ribeiro TP, Magno LN, et al. (2014). *Hancornia speciosa* latex for biomedical applications: physical and chemical properties, biocompatibility assessment and angiogenic activity. *J. of Mat. Scie. Mat. in Med.*, vol. 25, p. 2153-2162.
- Carvalho PCL, Soares WS, Ritzinger R and Carvalho JABS (2001). Conservação de fruteiras tropicais com a participação do agricultor. *Rev. Bras. de Fruticultura*. Jaboticabal, 23(3), 730 - 734.
- Costa TS, Silva AVC, Lédo AS, Santos ARF, et al. (2011). Diversidade de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. *Pesq. Agropec. Bras.* v.46 (5), 499-508.
- De Menezes IP, Gaiotto FA, Hoffman LV, Ciampi AY, et al. (2014). Genetic diversity and structure of natural populations of *Gossypium mustelinum*, a wild relative of cotton, in the basin of De Contas River in Bahia, Brazil. *Genet.*
- Fan L, Zhang MY, Liu QZ, Li LT, et al. (2013). Transferability of newly developed Pear SSR markers to other Rosaceae species. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 31: 1271-1282.
- Ferreira HC, Serra CP, Lemos VS, Braga FC, et al. (2007a). Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidyl-inositol 3-kinase. *J. of Ethnopharmacol.* 109: 161-4.
- Ferreira HC, Serra CP, Endringer DC, Lemos VS, et al. (2007b). Endothelium-dependent vasodilatation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. *Phytomedicine.* 14: 473-8.
- González-Pérez MA, Soza PA, Rivero E, González-González EA, et al. (2009). Molecular markers reveal no genetic differentiation between *Myrica rivas-martinezii* and *M. faya* (Myricaceae). *Ann. Bot.* 103(1), 79-86.
- Koch I, Rapini A, Simões AO, Kinoshita LS, et al. (2014). *Apocynaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at: [<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15558>]. Accessed October 31, 2014.
- Lederman IE, Silva Júnior JF, Bezerra JEF and Espíndola ACM (2000) Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). Jaboticabal, SP: Funep. p. 35.
- Li LH, Hu FX, Chen WS, Cai WP, et al. (2012) Genetic diversity of *Penicillium marneffeii* isolated from AIDS patients in Guangdong, China using randomly amplified polymorphic DNA. *Chin. Med. J.* 125(5), 823-827.
- Macedo M and Ferreira AR. (2004) Plantas medicinais usadas no tratamento dermatológico da Bacia do alto Paraguai, Mato Grosso. *Rev. Bras. Farmacogn.* 14: 40-44.
- Madesis P, Abraham EM, Kalivas A, Ganopoulos I, et al. (2014); Genetic diversity and structure of natural *Dactylis glomerata* L populations revealed morphological and microsatellite-based (SSR/IRSSR) markers. *Genet. and Mol. Res.* 13(2), 4226-4240.
- Marinho DG, Alviano DS, Matheus ME, Alviano CS et al. (2011). The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. *J. of Ethnopharmacol.* 135: 530-7.
- Mathithumilan B, Kadam NN, Biradar J, Reddy SH, et al. (2013) *BMC Plant. Biol.*, 1, 13: 194.
- Mishra RK, Gangadhar BH, Yu JW, Kim DH, et al. (2011) Development and characterization EST based SSR markers in Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*) *Plant. Omics. J.* v. 4 (3), p. 154-162.
- Monachino JA. (1945). A revision of *Hancornia* (Apocynaceae). *Lilloa, Tucuman*, v.11, p. 19-48.
- Moraes TM, Rodrigues CM, Kushima H, Baub TM, et al. (2008). *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. *J. of Ethnopharmacol.* 120: 161-8.

- Moura NF, Chaves JL, Venkovsky R, Naves RV, et al. (2011) Genetic structure of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) populations in the Cerrado region of Central Brazil. *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 27, n. 3, p. 473-481.
- Moura NF, Chaves JL, Venkovsky R, Zucchi MI, et al. (2005) Selection of RAPD markers to study genetic structure of *Hancornia speciosa* Gomes. *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 21, n. 3, p. 119-125.
- Pan H, Yang C, Wei Z and Jiang J (2006). DNA extraction of birch leaves by improved CTAB method and optimization of its ISSR system. *J For Res.* 4:298–300.
- Peakall R and Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics.* 28:2537–9.
- Perrier X and Jacquemoud-Collet JP (2006) DARwin software. Available at: <http://darwin.cirad.fr/>. Accessed February 23, 2013.
- Ritter MR, Sobierajski GR, Schenkel EP and Mentz LA (2002). Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. *Rev Bras Far Farmacogn.* 12: 51-62.
- Sargent DJ, Rys A, Nier, S, Simpson DW et al. (2007). The development and mapping of functional markers in *Fragaria* and their transferability and potential for mapping in other genera. *Theo. and App. Genet.*, v.114, p.373-384.
- Silva CG, Braga FC, Lima MP, Pesquero JL, et al. (2011). *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. *J. of Ethnopharmacol.* 137: 709-11.
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) et al. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification.
- Song SL, Lim PE, Phang SM, Lee WW, et al (2014). Development of chloroplast simple sequence repeat (cpSSR) for the intraspecific study of *Graularia tenuistipitata* (Graulariales, Rhodophyta) from different populations. *BMC Notes.* 7(1): 17, 2014.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, et al (2011). Mega5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. and Evol.* 28: 2731-2739.
- Young A, Boyle T, Brown T. (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol. Evol.* 11: 413-418.
- Wang BH, Zhu P, Yuan YL, Wang CB, (2014). Development of EST-SSR markers related to salt tolerance and their amplification in genetic diversity and evolution analysis in *Gossypium*. *Genet. and Mol. Res.*13(2), 3732-3746.
- WWF (2011) Cerrado, the Brazilian Savanna. Available: http://wwf.panda.org/what_we_do/where_we_work/cerrado/. Accessed January 10, 2012.
- Zucchi MI, Brondani RV, Pinheiro JB, Brondani C, et al. (2002). Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). *Mol. Evol. Notes.* 2: 512-514.