

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

MARINA SANTOS CARVALHO

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE *Euterpe edulis* Mart.**

ALEGRE-ES

2015

MARINA SANTOS CARVALHO

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE *Euterpe edulis* Mart.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Adésio Ferreira.

ALEGRE-ES

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

C331d Carvalho, Marina Santos, 1991-  
Diversidade e estrutura genética de *Euterpe edulis* Mart. / Marina Santos Carvalho. – 2015.  
58 f. : il.

Orientador: Adésio Ferreira.

Coorientadores: Marcia Flores da Silva Ferreira.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Melhoramento genético. 2. Conservação. 3. Palmitero juçara.  
4. Mata Atlântica. I. Ferreira, Adésio. II. Ferreira, Marcia Flores da  
Silva. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências  
Agrárias. IV. Título.

CDU: 575:631.52

---

MARINA SANTOS CARVALHO

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE *Euterpe edulis* Mart.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2015.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Adésio Ferreira**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Orientador**

---

**Pesquisadora Dr<sup>a</sup>. Fernanda Abreu Santana**  
**Universidade Estadual do Norte Fluminense**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Marcia Flores da Silva Ferreira**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Coorientadora**

*Dedico este trabalho aos meus pais, Inácio e Salvelina; aos meus irmãos, José, Jakelina, Gizelina e Joselino; e aos meus sobrinhos, Joyce, Rodrigo, Kayllane, Marcela, Reynan e Giovana.*

## AGRADECIMENTO

A Universidade Federal do Espírito Santo – UFES e ao programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de realizar o mestrado;

A FAPES e CNPq pelo financiamento do trabalho e a CAPES pela concessão de bolsa;

Ao meu orientador Dr. Adésio Ferreira, pelos ensinamentos científicos, pela dedicação e pela paciência;

À minha coorientadora Dr<sup>a</sup>. Marcia Flores, pela amizade, dedicação, paciência e por todos os ensinamentos;

Aos amigos do Laboratório de Genética e Melhoramento Vegetal: Paula Henrique, Luina, Paula Mauri, Drielli, Coralina, Regina, Eduardo, Kati, Matheus, Iana e Liziane, pelo companheirismo e os momentos de descontração;

Aos amigos do Laboratório de Biometria: José Henrique, Tiago, Clemliton, Fúlvia e Sephora, pela amizade e o alegre convívio;

Aos amigos: Alda, Angélica, Rodrigo, Amanda, Amélia, Wagner, José Dias, Khetrin, Stefanie e Luís, pela amizade e a agradável companhia;

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Francielle Martins, pela amizade, pela atenção e pelos ensinamentos;

Àqueles que são a base dessa conquista: meus pais Inácio e Salvelina, pela compreensão, o amor incondicional e pela dedicação;

Aos meus irmãos: Joselino, Jakelina, Gizelina e José, pelo carinho, apoio e incentivo;

Aos meus sobrinhos: Joyce, Rodrigo, Kayllane, Marcela, Reynan e Giovana, por toda a alegria que eles trouxeram a minha vida;

Ao meu avô Manoel pelo amor e cuidado;

A meus tios, tias, primos e demais familiares que sempre estiveram ao meu lado;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente;

E principalmente a Deus pelo dom da vida e por conceder-me força para alcançar este objetivo.

## **BIOGRAFIA**

MARINA SANTOS CARVALHO, filha de Inácio José de Carvalho e Salvelina Santos Lélis, nasceu na cidade de Picos, Piauí (PI), em 08 de agosto de 1991.

Concluiu o Ensino Fundamental em 2005, na Escola Municipal Antônio Tapety em Ipiranga do Piauí - PI e o ensino médio em 2008, na Unidade Escolar Dom Joaquim Rufino de Rêgo, em Ipiranga do Piauí - PI.

Graduou-se no Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Piauí - PI em março de 2013.

Em 2013 iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, linha de pesquisa Melhoramento, na Universidade Federal do Espírito Santo.

## RESUMO

CARVALHO, Marina Santos, M.Sc., Universidade Federal do Espírito Santo, fevereiro de 2015. **DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE *Euterpe edulis* Mart.** Orientador: Adésio Ferreira. Coorientadora: Marcia Flores da Silva Ferreira.

*Euterpe edulis* Mart., popularmente conhecida como palmitero juçara é uma palmeira endêmica da Mata Atlântica, que vem passando por intenso processo de extrativismo devido à exploração de palmito, produto de alto valor alimentício. Devido à fragmentação florestal e ao extrativismo ela pode estar perdendo sua diversidade genética e tornando-se mais propensa a entrar em extinção. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade e estrutura genética em seis municípios da região Sul do estado de Espírito Santo, visando gerar informação que possa ser usada em programas de conservação e melhoramento da espécie. Foi coletado material de 20 populações, seis destas com 39 indivíduos pertencentes à sub-região Sul e 14 populações com 121 indivíduos da sub-região Caparaó, totalizando 160 indivíduos. Foram utilizados 13 *primers* microssatélites. Os SSR amplificaram um total de 86 alelos que variaram de cinco a 11 alelos por *loci*, com média de 6,62 alelos. O Conteúdo de informação polimórfica foi superior a 0,56 em todos os *loci*. A heterozigosidade esperada foi maior que a observada em todas as populações e o índice de fixação foi positivo indicando excesso de homozigotos. Os índices de diversidade mostraram diferenciação moderada entre as 20 populações avaliadas ( $F_{ST}=0,18$ ;  $G_{ST}=0,17$ ;  $R_{ST}=0,23$ ) e presença de endogamia ( $F_{IS} = 0,35$ ). Os valores destes parâmetros foram semelhantes entre as populações de cada sub-região, no entanto Caparaó apresentou maior endogamia ( $F_{IS}=0,37$ ) e Sul maior diferenciação ( $F_{ST}=0,19$ ). A análise de variância molecular indicou elevada variação dentro de populações (80,64%) com valor moderado de  $F_{ST}$  (0,18). No agrupamento pelo método UPGMA foi formado três grupos, e na avaliação feita pelo programa STRUCTURE obteve melhor K igual a 3. Todos os grupos foram formados por populações de mais de uma localidade, e principalmente de uma mesma origem geográfica. Considerando ainda a existência de populações compostas por indivíduos divergentes e outras que apresentam alto nível de homozigosidade é necessário utilizar materiais de fontes diversas a fim de preservar e manter a diversidade. As informações deste trabalho reforçam a necessidade de serem

traçadas e implementadas políticas públicas como apoio e desenvolvimento de programas de melhoramento da espécie visando determinar métodos de manejo e conservação da espécie.

**Palavras-chave:** melhoramento genético, conservação, palmitero juçara, Mata Atlântica.

## ABSTRACT

CARVALHO, Marina Santos, M.Sc., Universidade Federal do Espírito Santo, fevereiro de 2015. **DIVERSITY AND GENETIC STRUCTURE OF *Euterpe edulis* Mart.** Adviser: Adésio Ferreira. Co-advisers: Marcia Flores da Silva Ferreira.

*Euterpe edulis* Mart., popularly known as juçara palm tree is an endemic palm tree of the Atlantic Forest that has been passing through an intense process of extractivism due to palm tree exploration, a product of high alimentary value. Due to the forest fragmentation and the extractivism, the juçara palm tree may be losing its genetic diversity and becoming more inclined to enter in extinction. The objective of this work was to evaluate the diversity and genetic structure in six municipalities of the South region of the state of Espírito Santo, aiming to generate information that may be used in programs of conservation and breeding of the species. Materials from 20 populations were collected, six of these populations with 39 individuals belonging to the South sub-region and 14 populations with 121 individuals from the Caparaó sub-region, totalizing 160 individuals. Thirteen microsatellite primers were used. The SSR amplified a total of 86 alleles which varied from five to 11 alleles per *loci*, with an average of 6.62 alleles. The polymorphism information content was higher than 0.56 in all the *loci*. The expected heterozygosity was higher than the observed in all the populations and the fixation index was positive indicating excess of homozygotes. The diversity indexes showed moderate differentiation among the 20 evaluated populations ( $F_{ST}=0.18$ ;  $G_{ST}=0.17$ ;  $R_{ST}=0.23$ ) and endogamy presence ( $F_{IS} = 0,35$ ). The values of these parameters were similar among the populations of each sub-region, nevertheless Caparaó presented higher endogamy ( $F_{IS}=0,37$ ) and the South region presented higher differentiation ( $F_{ST}=0.19$ ). The analysis of molecular variance indicated elevated variation among the populations (80.64%) with moderated value of  $F_{ST}$  (0.18). On the cluster produced by the UPGMA method, three groups were formed, and on the evaluation done by the program STRUCTURE best K, equal to 3 was obtained. All the groups were formed by populations of more than one locality and mainly of the same geographic origin. Considering the existence of populations compounded by divergent individuals and others that present high level of homozygosity it is necessary to use materials of diverse sources aiming to preserve and maintain the diversity. The information of this work reinforce the necessity of

implementing and delineating public politics as support and development of breeding programs of the species aiming to determine management methods and species conservation.

**Key-words:** Genetic improvement, Conservation, Juçara palm tree, Atlantic Forest.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Mapa de localização dos pontos de coletas. (A) Municípios com seus respectivos pontos de coleta. (B) Estado do Espírito Santo. Os municípios de Ibitirama, Alegre e Guaçui pertencem à sub-região Caparaó; Jerônimo Monteiro, Muqui e Mimoso do Sul pertencem à sub-região Sul. ....20
- Figura 2-** Coleta de material para extração do DNA. (A) Palmiteiro juçara em seu habitat natural. (B) Detalhe da estirpe. (C) Parte externa da amostra retirada da estirpe. (D) Parte interna da amostra retirada da estirpe mostrando o córtex. ....20
- Figura 3-** Perfil eletroforético do primer. (A) EE 5. (B) EE8. ....25
- Figura 4-** Gráficos obtidos pela análise no STRUCTURE, cada grupo é representado por uma cor, cada indivíduo por uma barra vertical. (A) Gráficos obtidos com K=2, K=3, K=4, K=4 e K=8, (B) detalhe de cada indivíduo assumindo K=3. ....30
- Figura 5-** Dendrograma UPGMA de 20 populações de *E. edulis* usando a distância genética de Nei (1973). ....31

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Populações de <i>Euterpe edulis</i> amostradas em seis municípios no Sul do Estado do Espírito Santo nas sub-regiões Sul e Caparaó com suas denominações, tamanho amostral, coordenadas geográficas e Altitude.....	19
<b>Tabela 2-</b> Descrição dos loci de microssatélites utilizados .....	21
<b>Tabela 3-</b> Informações sobre 13 loci de microssatélites: .....	24
<b>Tabela 4-</b> Características das populações amostradas de <i>Euterpe edulis</i> , para 13 loci polimórficos de microssatélite.....	25
<b>Tabela 5-</b> Probabilidade do Teste Exato de Fisher para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, em 20 populações de <i>Euterpe edulis</i> M. com base em microssatélites.....	26
<b>Tabela 6-</b> Índices de diversidade genética baseados nas frequências alélicas de 13 loci microssatélites. ....	28
<b>Tabela 7-</b> Resultado da AMOVA para análise de estrutura genética de populações com dois e três níveis hierárquicos e Análises dentro de cada sub-região .....	28
<b>Tabela 8-</b> Matriz de pares de FST (WEIR; HILL, 2002) entre populações (diagonal inferior) e número absoluto de migrantes ( $M=2Nm$ ) entre populações (diagonal superior) estimado com base em FST. ....	29
<b>Tabela 9-</b> Resultado da AMOVA para análise de estrutura genética de populações com dois níveis hierárquicos e Análises dentro de cada região .....	32
<b>Tabela 10-</b> Índices de diversidade genética baseados nas frequências alélicas de 13 loci microssatélites. ....	32
<b>Tabela 11-</b> Probabilidade do Teste Exato de Fisher para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, em 3 grupos de <i>Euterpe edulis</i> M. com base em microssatélites..	32
<b>Tabela 12-</b> Matriz de pares de FST (WEIR; HILL, 2002) entre populações (metade inferior) e número absoluto de migrantes ( $M=2Nm$ ) entre populações (metade superior) estimado com base em FST. ....	32

## LISTAS DE SIGLAS

SSR	- <i>Simple Sequence Repeats</i>
STR	- <i>Short Tandem Repeats</i>
DNA	- <i>Deoxyribonucleic acid</i>
PCR.	- <i>polymerase chain reaction</i>
CTAB	- Brometo de cetil- trimetil amônio
AL	- Município de Alegre
GU	- Município de Guaçuí
IB	- Município de Ibitirama
JM	- Município de Jerônimo Monteiro
MI	- Município de Mimoso do Sul
MU	- Município de Muqui
A	- Número de alelos
HE	- Heterozigosidade esperada
PIC	- Conteúdo de informação polimórfico
<i>f</i>	- coeficiente de endogamia
<i>A/loco</i>	- número médio de alelos por locos
APRIV.	- número de alelos privados
$F_{IS}$	- coeficiente de endogamia
HW	- Hardy- Weinberg
$F_{IS}$	- Índices de fixação dentro das populações
$F_{IT}$	- Índice de fixação total
$F_{ST}$	- Divergência genética entre populações
AMOVA	- Análises de variância molecular
UPGMA	- <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
MCMC	- <i>Monte Carlo Markov Chain</i>
A280/A260	- Concentração de DNA em relação às proteínas
A260/A230	- Concentração de DNA em relação a metabolitos secundários e componentes do tampão

**SUMÁRIO**

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2.1 Geral.....	18
2.2 Específicos .....	18
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
3.1 Área de estudo e coleta de material.....	19
3.2 Extração e amplificação do DNA genômico .....	20
3.3 Análise de dados.....	22
3.3.1 Variabilidade genética dentro de populações.....	22
3.3.2 Variabilidade genética interpopulacional .....	22
<b>4 RESULTADO .....</b>	<b>23</b>
4.1 Diversidade dos <i>loci</i> e diferenciação dentro de populações.....	23
4.2 Diferenciação entre populações .....	26
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>39</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é um complexo de ecossistemas de grande importância, pois abriga uma parcela significativa da diversidade biológica do Brasil e do mundo. Possui níveis altos de endemismo e uma pequena fração da floresta original, sendo considerado um “hotspot” de biodiversidade (MYERS et al., 2000). Originalmente apresentava uma área de 1.300.000 km<sup>2</sup> ao longo da costa brasileira, porém este bioma foi reduzido a menos de 7% (IBGE, 2014). Ao incluir florestas secundárias intermediárias e pequenos fragmentos (<100 ha), esse percentual sobe para 11,4% (RIBEIRO et al., 2009). No estado do Espírito Santo restam 11% de cobertura natural e desta quantia a maior parcela da vegetação é secundária, devido a mudanças climáticas, fragmentação de habitat, fogo, desmatamento, densidade populacional e agricultura (ICMbio, 2010).

O processo de fragmentação florestal da Mata Atlântica é extremamente crítico tornando-a um dos conjuntos de ecossistemas mais ameaçados de extinção (INPE, 2009). A fragmentação das florestas tem múltiplos efeitos sobre a biota, podendo alterar a diversidade genética e a composição das comunidades nos fragmentos e mudar processos ecológicos como a polinização e a ciclagem de nutrientes. A fragmentação tem grande influência antrópica e diversas espécies e até mesmo famílias de plantas têm sido afetadas e estão perdendo sua variabilidade genética. Essas espécies podem entrar em extinção, como é o caso da família das palmeiras, Arecaceae, que inclui o gênero *Euterpe* (SILVA et al., 2006; MAGNAGO et al., 2014).

O gênero *Euterpe* reúne 28 espécies distribuídas das Antilhas à América do Sul, notadamente nas regiões com florestas tropicais (SUFRAMA, 2013; JARDIM, 2005). A espécie *Euterpe edulis* Mart., popularmente conhecida como palmito de juçara é uma palmeira amplamente distribuída na Mata Atlântica. Ela é encontrada principalmente nos estados brasileiros do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais e Bahia (LORENZI, 2006).

Da palmeira juçara se extrai o palmito que possui alto valor alimentício e comercial (LIMA et al., 2008). No entanto, a espécie não perfilha e a retirada do palmito de plantas jovens que nunca floresceram ou frutificaram impede que a árvore complete seu ciclo reprodutivo, provocando o seu desaparecimento em

virtude do longo período demandado para produção de sementes (seis a nove anos) (SEOANE, 2007).

O palmitero juçara é uma espécie que produz grande quantidade de frutos (superior a 300.000 frutos ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>) e possui um amplo período de produção (maio a novembro), apresentando relevância à manutenção da fauna, pois seu fruto é consumido por um grande número de aves, mamíferos e roedores (REIS; KAGEYAMA, 2000; FADINI et al., 2009). A fauna, por sua vez, é responsável pela dispersão dos frutos, contribuindo para o fluxo gênico da espécie (SEOANE et al., 2005; CASTRO, 2007). O fruto é redondo, cresce em cachos e tem um pericarpo que cobre uma semente dura. As bagas possuem diâmetro de cerca de 1 a 1,5 cm e a semente constitui 85% do fruto. Durante a maturação, o pericarpo evolui de verde a púrpura escuro, ou quase negro. Normalmente o palmitero juçara é utilizado sob a forma de polpa ou sumo (BICUDO; RIBANI, 2014).

Devido a presença de altos teores de compostos funcionais, como antocianinas que por sua vez possuem propriedades antioxidantes (BRITO et al., 2007; INÁCIO et al., 2013, COISSON et al., 2005; ROSSO; MERCADANTE., 2007; RUFINO et al., 2010) o palmitero juçara pode ser classificado como uma “superfruta”. Uma dieta rica em compostos com propriedades antioxidantes retarda o envelhecimento e diminui o risco de muitas doenças crônicas comuns, principalmente as cardiovasculares (SZAJDEK; BOROWSKA, 2008).

Populações naturais inteiras de *E. edulis* têm sido extintas em várias áreas de ocorrência natural (BECKMANN-CAVALCANTE et al., 2012), colocando-a na lista brasileira das espécies ameaçadas de extinção e também na Lista da Flora ameaçada do Espírito Santo (BRASIL, 2008; BIODIVERSITAS, 2013).

Recentemente, ações de recuperação de áreas degradadas passaram a considerar, além de questões como a alta diversidade de espécies nativas e a escolha de espécies de uso múltiplo, a necessidade de existência de autossustentabilidade em longo prazo nos plantios de recuperação (BRANCALION et al., 2012; RODRIGUES et al., 2009). Entretanto, apesar da crescente importância da ecologia da restauração, esta é uma ciência relativamente nova, existindo poucos critérios para a implantação de populações geneticamente autossustentáveis (HUFFORD; MAZER, 2003). O critério mais importante nesse sentido é o nível de variabilidade genética necessário para assegurar o sucesso em longo prazo das populações em plantios de recuperação, cuja definição, entretanto, é complexa e

pode variar tanto quanto espécies e populações naturais variam (MCKAY et al., 2005).

A proteção da diversidade dentro das espécies deve ser uma prioridade, pois a conservação genética permite a manutenção em longo prazo da espécie e a continuidade de sua evolução (BARRETT; KOHN, 1991; YOUNG et al., 2000). Desse modo, fica clara a necessidade de estudos que demonstrem a situação da diversidade genética em população de *E. edulis*. Para este fim, a utilização de marcadores moleculares de DNA em estudos com espécies vegetais de ocorrência em áreas florestais é tida como referência em trabalhos de vários autores (GUIDUGLI, 2010; HAJJAR, 2008; JAMNADASS, 2005; MARTINEZ, 2002).

Os marcadores moleculares microssatélites também chamados SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou STR (*Short Tandem Repeats*), são regiões de DNA (*deoxyribonucleic acid*) compostas de pequenos motivos de um a seis nucleotídeos repetidos em *tandem*, que são amplamente distribuídos por todo o genoma de eucariontes (BHARGAVA; FUENTES, 2010). Devido à instabilidade dos microssatélites, estes são extremamente úteis em estudos de genética (ELLEGREN, 2004). Assim, os microssatélites vêm sendo usados para diversos estudos como genética de populações (KALIA et al., 2011), conservação de espécies, variação genética, estrutura e diferenciação de populações, fluxo gênico, história demográfica, eventos de hibridação (OUBORG et al., 2010).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar a diversidade e estrutura genética de *Euterpe edulis* através de marcadores moleculares microssatélites em fragmentos florestais em seis municípios na região Sul do Estado do Espírito Santo, visando proporcionar informações para a delimitação de estratégias de manejo e reflorestamento mais eficientes que auxiliem na manutenção de alta variabilidade genética, diminuindo o risco de extinção da espécie.

### **2.2 Específicos**

1. Quantificar os níveis de variabilidade genética em populações naturais da espécie empregando marcadores microssatélites;
2. Avaliar como a diversidade genética está particionada entre e dentro das populações;
3. Determinar a estrutura genética em populações de *E. edulis*;
4. Selecionar populações divergentes de *E. edulis* no estado do Espírito Santo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

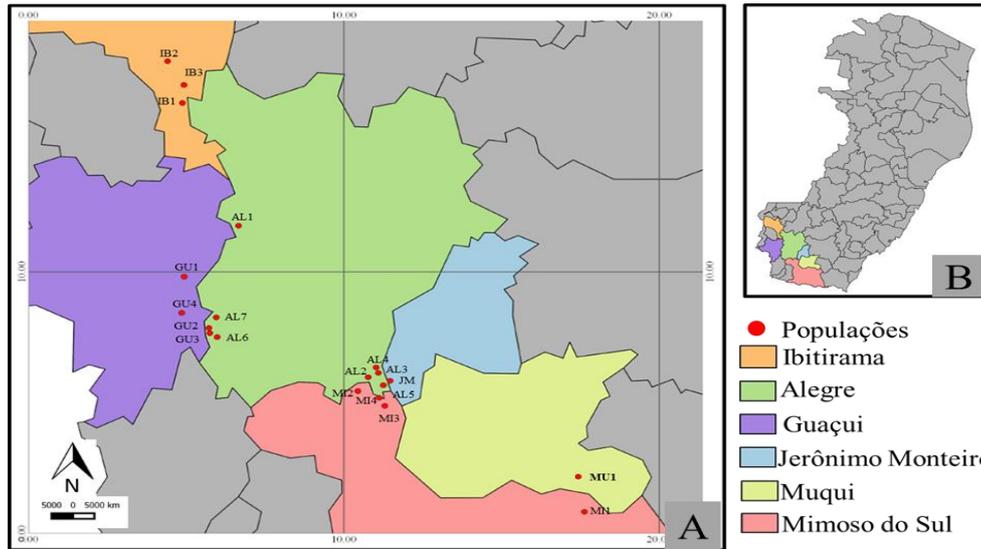
#### 3.1 Área de estudo e coleta de material

Os indivíduos para análises da diversidade genética foram coletados em 20 fragmentos florestais em seis municípios da região Sul do Espírito Santo. Foram amostrados 160 indivíduos do palmitero juçara, em populações com cinco a 10 indivíduos cada (Tabela 1, Figura 1).

Amostras do córtex de cada indivíduo foram coletadas em campo (Figura 2), enroladas em papel e colocadas em recipiente fechado contendo sílica gel. Posteriormente foram armazenadas em freezer -30 no laboratório até a extração de DNA.

**Tabela 1-** Populações de *Euterpe edulus* amostradas em seis municípios no Sul do Estado do Espírito Santo nas sub-regiões Sul e Caparaó com suas denominações, tamanho amostral, coordenadas geográficas e Altitude.

Município	Denominação	Tamanho amostral	Latitude	Longitude	Altitude (m)
<b>Sub-região Caparaó</b>					
Alegre	AL 1	7	20°42'47.38"	41°35'31.52"	625
	AL 2	8	20°52'23.51"	41°27'57.53"	714
	AL 3	7	20°52'40.17"	41°28'30.88"	693
	AL 4	9	20°52'2.07"	41°28'4.89"	707
	AL 5	9	20°53'11.62"	41°27'41.51"	861
	AL 6	9	20°49'47.93"	41°37'5.02"	800
	AL 7	10	20°48'46.35"	41°36'43.92"	650
Guaçuí	GU 1	10	20°48'18.52"	41°36'20.82"	770
	GU 2	8	20°46'6.77"	41°38'28.13"	735
	GU 3	8	20°49'27.61"	41°37'7.80"	779
	GU 4	6	20°50'3.30"	41°36'41.00"	815
Ibitirama	IB 1	10	20°48'28.68"	41°38'36.10"	601
	IB 1	10	20°34'47.03"	41°38'33.82"	736
	IB 3	10	20°32'3.37"	41°39'22.04"	747
<b>Sub-região Sul</b>					
Jerônimo Monteiro	JM 1	6	20°52'54.30"	41°27'19.50"	810
Mimoso do Sul	MI 1	9	21°1'27.26"	41°16'48.54"	365
	MI 2	8	20°53'34.63"	41°29'4.10"	768
	MI 3	6	20°54'32.45"	41°27'36.60"	680
	MI 4	5	20°33'36.53"	41°38'28.83"	793
Muqui	MU 1	6	20°59'9.77"	41°17'8.76"	404



**Figura 1-** Mapa de localização dos pontos de coletas. (A) Municípios com seus respectivos pontos de coleta. (B) Estado do Espírito Santo. Os municípios de Ibitirama, Alegre e Guaçuí pertencem à sub-região Caparaó; Jerônimo Monteiro, Muqui e Mimoso do Sul pertencem à sub-região Sul.



**Figura 2-** Coleta de material para extração do DNA. (A) Palmiteiro juçara em seu habitat natural. (B) Detalhe da estirpe. (C) Parte externa da amostra retirada da estirpe. (D) Parte interna da amostra retirada da estirpe mostrando o córtex.

### 3.2 Extração e amplificação do DNA genômico

A extração do DNA genômico, realizada a partir das amostras do córtex coletadas de árvores adultas (Apêndice A), foi baseada no método CTAB (Brometo de cetil-trimetil amônio) (DOYLE; DOYLE, 1990) com modificações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Após a extração, as concentrações de DNA das amostras foram estimadas, com o uso de espectrofotômetro (*nanoDrop 2000*) e a integridade

do DNA foi verificada por gel de agarose 0,8%. A partir do resultado foi realizada a diluição das amostras de DNA em *Água Tipo I* para a concentração de 10 ng/μL.

As regiões de microssatélites foram amplificadas por PCR, utilizando 13 *primers* SSR desenvolvidos para *E. edulis* por Gaiotto et al. (2001). A reação de 13 μL foi composta por: 30 ng de DNA genômico; 1X de tampão 10 (phoneutria); 0,2 μM de cada *primer* (*forward* e *reverse*); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,25 mM dNTPs; e 1,2 U de Taq DNA polimerase. Foi utilizado o programa: 94°C por quatro minutos; 30 ciclos compostos por 94°C por um minuto; temperatura de anelamento do *primer* (Tabela 2) por um minuto; 72°C por um minuto; uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em géis de poliacrilamida 6% e tampão TAE 1 X a 100 volts com duração de aproximadamente 3 horas. Após a eletroforese os géis foram corados com brometo de etídio (10 mg/ml) e fotografados por sistema de fotodocumentação.

**Tabela 2-** Descrição dos *loci* de microssatélites utilizados

SSR	Sequência dos <i>primers</i>	Motivo	A	TA
EE2	F: CCAAGGACGCAATCTCAA R: AGCGAGGCAGAACACGTA	(AG) <sub>22</sub>	82-110	62
EE3	F: TTCGCGCACACTGAGAG R: GGTAGCGTTGATTGGTCC	(AG) <sub>11</sub> (AG) <sub>16</sub>	194-210	56
EE5	F: GAGAACACATAAGCTGC R: GCTTCAGAATTAGGACA	(AG) <sub>24</sub>	102-136	56
EE8	F: GTATTCCAATGTGCTCACAG R: GTGCAGTAGGCTTCTAGTACC	(AG) <sub>20</sub>	110-132	58
EE9	F: TTCTCTCGCATGCCTCG R:GCCACACACACACAGTAGAATC	(AG) <sub>19</sub>	90-110	62
EE15	F: CCACACAGACACGCAGATAG R: CCTCATGAAGCATCGACCT	(AG) <sub>21</sub>	140-162	64
EE32	F: CCGCCTGGTGAGCCTCT R:CAGTGCACCAAGGAAGTCCAT	(AG) <sub>20</sub>	204-234	62
EE41	F: CCTTGCAGTTTATGGCTACG R: CCATTGAGAGGGAATGAGGT	(AG) <sub>21</sub> (TG) <sub>13</sub>	170-190	48
EE43	F: GCGAAAGGCTAACAACGTTAT R: AGCGAACCAACCAAGAAGAC	(AG) <sub>16</sub>	118-132	56
EE45	F: AAAGAAATTGGCGTGACATC R: AACCAGTCTTCTCCCTCTCG	(AG) <sub>28</sub>	70-154	56
EE47	F: CGAAATCAATGGTTTTCAGTG R: AATTATTGTTGTGGGCAGC	(AG) <sub>20</sub>	214-246	56
EE54	F: CATGTATCTAAGGAACAAGG R: CTGTGCTCTCTCATTCTCA	(AG) <sub>25</sub>	140-160	56
EE63	F: CCGATATGCTCAAATCAATG R: ACGAGAGGAATCAAAGAACC	(AG) <sub>18</sub>	106-132	56

A: Amplitude alélica em pares de base (pb); TA: temperatura de anelamento. Fonte: Gaiotto et al, 2001.

### 3.3 Análise de dados

#### 3.3.1 Variabilidade genética dentro de populações

Foram realizadas as análises descritivas dos *loci* individuais em todos os indivíduos e obtidos: o número de alelos ( $A$ ), heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), conteúdo de informação polimórfico (PIC); e coeficiente de endogamia ( $f$ ) utilizando o programa Genes (CRUZ, 2013).

Nas análises da diversidade genética para as populações foram calculados: o número médio de alelos por *loci* ( $A/loco$ ); número de alelos privados ( $A_{PRIV.}$ ); heterozigosidade esperada ( $H_E$ ); heterozigosidade observada ( $H_O$ ); coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) (WRIGHT, 1951); e desequilíbrio de ligação nos *loci*. Também foi verificado pelo teste de Fisher se as frequências alélicas e genotípicas de cada loco se encontram em aderência às proporções de Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Estas análises foram realizadas no programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2001).

#### 3.3.2 Variabilidade genética interpopulacional

A variabilidade genética interpopulacional foi estimada pela estatística  $F$  de Wright (1951) de acordo com os métodos de Weir & Cockerham (1984): índices de fixação dentro das populações ( $F_{IS}$ ); índice de fixação total ( $F_{IT}$ ); divergência genética entre populações ( $F_{ST}$ ); além do índice  $G_{ST}$  (NEI, 1973) e a estimativa  $R_{ST}$  (SLATKIN, 1995). Para isto foi utilizado o software FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 1995), seguindo o modelo usando o método de reamostragem *bootstrap*, com 95% de intervalo de confiança e 1000 permutações.

A diferenciação das populações por análises de variância molecular (AMOVA), para diferenças intra e interpopulacional foi estimada com dois e três níveis hierárquicos considerando as 20 populações, em seguida foi calculado considerando sub-regiões Sul e Caparaó como grupos distintos. Utilizando o resultado obtido pelos agrupamentos hierárquicos UPGMA e o bayesiano (STRUCTURE) foi estimado outra AMOVA, sendo que esta considera três grupos. As análises foram realizadas pelo software Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER et al., 2006) e a significância testada com 1000 permutações.

O parâmetro  $F_{ST}$  e os outros índices permitem estimar, indiretamente, o fluxo

gênico que ocorreu no passado que elucidada a divergência genética que ocorre entre as populações (SLATKIN, 1987) e mede a dispersão que resultou em transmissão efetiva de genes (BROQUET; PETIT, 2009). Esta metodologia se dá com base no número de migrantes por geração ( $Nm=2N$ ). Foi calculado usando o programa Arlequin v.3.1.

A inferência de grupos genéticos, nos indivíduos das populações de *E. edulis* foi feita com uma abordagem Bayesiana *Monte Carlo Markov Chain* (MCMC) (EXCOFFIER; HECKEL, 2006), utilizando o software STRUCTURE v 2.2 (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2007).

As distâncias genéticas de Nei entre populações (1978) foram estimadas pelo índice de Nei e posteriormente organizadas em matrizes que serviram para o agrupamento pelo método hierárquico da média não ponderada-UPGMA (*Unweightedpair-group method with arithmetic averages*) (SNEATH; SOKAL, 1973). Essas análises foram computadas pelo programa genes (CRUZ, 2013).

## 4 RESULTADO

### 4.1 Diversidade dos *loci* e diferenciação dentro de populações

Os 13 *loci* microssatélites foram polimórficos e informativos, apresentando um total de 86 alelos que variaram de cinco a 11 alelos por *loci*, com média de 6,62 alelos (Tabela 3). Os *loci* EE2 e EE63 amplificaram 11 e nove alelos respectivamente, e os *loci* EE9 e EE41 cinco. O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) variou de 0,56 (EE41) a 0,80 (EE63) com média de 0,70 (Tabela 3). Na figura 3 pode ser observado o perfil de amplificação dos *primers* EE5 e EE8.

O número médio de alelos por populações variou de 2,77 a 4,38. As populações GU1 e AL7 tiveram o maior número de alelos por *loci* (em média 4,38; 4,31, respectivamente) e as GU4 e AL3 o menor (2,77; 2,85) (Tabela 4).

A heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) variou de 0,52 (AL3) a 0,66 (AL1) com média de 0,60. A heterozigosidade observada ( $H_O$ ) apresentou variação de 0,25 (AL2) a 0,52 (AL7, MI3) e média 0,40. Em todas as populações os valores de  $H_E$  foram maiores que  $H_O$ , evidenciando que as populações analisadas apresentam endogamia (Tabela 4).

As sub-regiões Sul e Caparaó apresentaram  $H_E$  e  $H_O$  semelhante (Sul:  $H_E =$

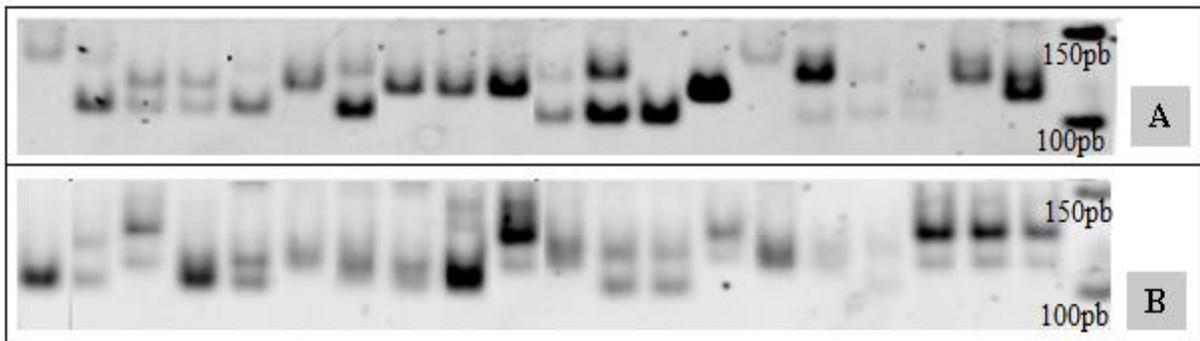
0,60; e  $H_o = 0,40$ ; Caparaó:  $H_E = 0,61$ ; e  $H_o = 0,38$ ). Todas as populações apresentaram o coeficiente de endogamia ( $f$ ) positivo, cuja média total foi de (0,36), indicativo de excesso de homozigotos. A população AL2 apresentou o maior valor (0,56) e a GU4 (0,08) o menor, as duas pertencem à sub-região do Caparaó, que teve média de 0,34. Na sub-região Sul a variação foi de 0,16 (MI3) a 0,53 (MI4) com média de 0,39. As populações MI3, AL6 e GU6 apresentaram um alelo privado cada.

Pelo teste exato de Fisher verificou-se que para algumas populações a maioria dos *loci* não apresentou equilíbrio de Hardy-Weinberg (WH) (Tabela 5). Duas populações do município de Ibitirama (sub-região Caparaó) apresentaram maior número de *loci* em desequilíbrio de HW (IB1, 7 *loci*; IB2, 7). As populações que apresentaram menor número foram GU4 (Sub-região Caparaó) com um *loci* em desequilíbrio e MI3 e MI4 com dois desequilíbrios, ambas da sub-região Sul. O loco EE9 mostrou desvio significativo do equilíbrio de HW em 12 das 20 populações, e os *loci* EE54 e EE63 em 9 e 11, respectivamente. EE3 exibiu menos populações em desequilíbrio (duas) (Tabela 5). Os *loci* com maior número de populações em desequilíbrio de HW também apresentaram taxas elevadas dos coeficientes de endogamia (EE9=0,80; EE54=0,69; EE63=0,68) (Tabela 3), portanto devem ter contribuído para a manifestação de endogamia nas populações.

**Tabela 3-** Informações sobre 13 *loci* de microssatélites.

<i>Locí</i>	A	NA	$H_E$	$H_o$	F	PIC
EE2	90 - 130	11	0,85	0,45	0,47	0,79
EE3	190 - 217	6	0,72	0,47	0,35	0,67
EE5	106 - 148,1	6	0,78	0,48	0,39	0,74
EE8	104 - 137	5	0,72	0,38	0,48	0,67
EE9	93 - 104	5	0,65	0,13	0,80	0,59
EE15	137 - 16	7	0,79	0,68	0,14	0,75
EE32	235 - 264	6	0,74	0,40	0,45	0,70
EE41	133 - 153	5	0,60	0,36	0,40	0,56
EE43	92 - 135	6	0,68	0,39	0,43	0,65
EE45	109 - 163	7	0,75	0,45	0,40	0,71
EE47	238 - 270	6	0,76	0,49	0,36	0,72
EE54	106 - 136	7	0,77	0,24	0,69	0,73
EE63	104 - 126	9	0,83	0,27	0,68	0,80
Média	—	6,62	0,74	0,40	0,46	0,70

NA, número total de alelos por loco; A: Amplitude alélica;  $H_E$ , heterozigosidade esperada;  $H_o$ , heterozigosidade observada;  $f$ : coeficiente de endogamia; PIC: conteúdo de informação polimórfico.



**Figura 3-** Perfil eletroforético do *primer*. (A) EE 5. (B) EE8.

**Tabela 4-** Características das populações amostradas de *Eutерpe edulis*, para 13 *loci* polimórficos de microssatélite.

População	TA	A/locu	H <sub>E</sub>	H <sub>o</sub>	F
<b>Sub-região Caparaó</b>					
AL1	7	3,69	0,66	0,42	0,38
AL2	8	3,31	0,56	0,25	0,56
AL3	7	2,85	0,52	0,34	0,37
AL4	9	3,54	0,56	0,44	0,22
AL5	9	3,46	0,58	0,40	0,31
AL6	9	3,38	0,58	0,35	0,42
AL7	10	4,31	0,71	0,52	0,28
GU1	10	4,38	0,63	0,46	0,29
GU2	8	4,08	0,63	0,42	0,35
GU3	8	3,77	0,58	0,41	0,31
GU4	6	2,77	0,54	0,50	0,08
IB1	10	4,08	0,58	0,39	0,35
IB2	10	4,08	0,63	0,33	0,48
IB3	10	3,85	0,63	0,39	0,39
Média	-----	3,68	0,60	0,40	0,34
<b>Sub-região Sul</b>					
JM1	6	3,23	0,65	0,44	0,35
MI1	9	3,38	0,56	0,35	0,40
MI2	8	3,23	0,56	0,34	0,41
MI3	6	3,54	0,61	0,52	0,16
MI4	5	3,00	0,61	0,30	0,53
MU1	6	3,00	0,65	0,35	0,47
Média	-----	3,23	0,61	0,38	0,39
Média total	-----	3,55	0,60	0,40	0,36

TA, tamanho amostral; A/locu, número médio de alelos por *loci*; H<sub>E</sub>, heterozigiosidade esperada; H<sub>o</sub>, heterozigiosidade observada; e f, coeficiente de endogamia.

**Tabela 5-** Probabilidade do Teste Exato de Fisher para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, em 20 populações de *Euterpe edulis* M. com base em microsatélites.

Populações	Loci												
	EE2	EE3	EE5	EE8	EE9	EE5	EE32	EE41	EE43	EE45	EE47	EE54	EE63
	<b>Região Caparaó</b>												
AL1	0,001*	0,002*	0,125	0,103	0,088	0,017*	0,018*	0,395	0,324	0,261	0,307	0,000*	1,000
AL2	0,000*	0,107	0,139	0,166	0,068	0,189	0,009*	1,000	0,192	0,040*	0,012*	0,003*	0,021*
AL3	0,090	0,774	0,479	1,000	0,015*	0,253	0,012*	1,000	0,324	0,028*	0,087	0,012*	0,095
AL4	0,100	1,000	0,123	0,019*	0,012*	0,238	0,016*	0,062	1,000	1,000	0,024*	0,150	0,047*
AL5	1,000	0,064	0,749	0,048*	0,004*	0,012*	0,091	0,037*	0,059	0,351	0,653	0,018*	0,023*
AL6	0,062	0,003*	0,768	0,511	0,000*	0,590	0,336	0,019*	0,007*	0,057	0,175	1,000	0,088
AL7	0,209	0,601	0,189	1,000	0,001*	0,553	0,089	0,045*	0,005*	0,001*	0,175	0,010*	0,001*
GU1	0,002*	0,471	0,046*	0,001*	0,027*	0,729	0,094	0,486	0,454	0,851	0,010*	0,002*	0,057
GU2	0,010	0,569	0,528	0,000*	0,005*	0,359	0,015*	1,000	0,124	0,699	0,108	0,048	0,136
GU3	0,002*	0,972	0,024*	0,027*	0,007*	0,015*	1,000	1,000	1,000	0,540	0,219	0,450	0,005*
GU4	0,335	0,222	0,023*	0,098	1,000	0,309	1,000	0,428	1,000	0,227	1,000	0,482	1,000
IB1	0,000*	1,000	0,408	0,010*	0,001*	0,806	0,020*	1,000	0,104	0,846	0,004*	0,002*	0,008*
IB2	0,001*	0,188	0,001*	0,032	0,049*	0,010*	0,183	1,000	0,160	0,375	0,000*	0,000*	0,000*
IB3	0,300	0,425	0,012*	0,000	0,001*	0,050	0,014*	0,482	1,000	0,041*	0,003*	0,062	0,000*
	<b>Região Sul</b>												
JM1	0,662	0,087	0,057	0,026*	0,054	0,023*	1,000	0,204	0,624	1,000	0,001*	0,023	0,052
M1	0,003*	0,641	0,005*	0,160	0,076	0,083	0,520	0,031*	0,000*	1,000	0,866	0,068	0,000*
M2	0,003*	1,000	0,283	1,000	1,000	0,112	0,016*	0,049*	0,061	0,026*	0,054	0,000*	0,044*
M3	0,796	0,272	0,316	0,150	1,000	0,205	1,000	0,091	0,002*	0,291	0,032*	1,000	0,143
M4	0,007*	0,355	0,047*	0,359	0,108	0,320	0,088	0,111	0,080	1,000	0,843	1,000	0,200
MU1	0,055	0,203	0,101	0,008*	0,006*	1,000	0,330	0,209	0,386	0,519	0,573	0,150	0,003*

\* Significativo pelo teste de Fisher ( $P > 0,05$ )

## 4.2 Diferenciação entre populações

Os índices de diversidade mostraram diferenciação moderada entre as 20 populações avaliadas ( $F_{ST}=0,18$ ;  $G_{ST}=0,17$ ;  $R_{ST}=0,23$ ) e alta diferenciação dentro das populações ( $F_{IS} = 0,35$ ) (Tabela 6). Os valores destes parâmetros foram semelhantes entre as populações de cada sub-região. A sub-região Caparaó apresentou maior endogamia ( $F_{IS}=0,37$ ) e a sub-região Sul maior diferenciação ( $F_{ST}=0,19$ ). As estimativas de  $R_{ST}$  foram iguais para as duas regiões e maior que as estimativas obtidas para  $G_{ST}$ . O  $F_{IT}$  para todas as populações foi de 0,47 e considerando cada sub-região os  $F_{IT}$  foram de 0,46 e 0,48 para sub-região sul e Caparaó, respectivamente demonstrando-se semelhantes (Tabela 6).

A AMOVA considerando dois níveis hierárquicos indicou elevada variação dentro de população (80,64%). Com três níveis hierárquicos a variação se manteve maior dentro de populações (53,23%), seguida da variação entre indivíduos dentro de populações (28,98%) e a variação entre populações teve o menor nível (17,79)

(Tabela 7). Estes resultados confirmam a alta variação encontrada dentro das populações ( $F_{IS}=0,37$ ) (Tabela 6).

A AMOVA para cada sub-região revelou que tanto a sub-região Caparaó quanto a Sul apresentaram maior variação intrapopulacional (82,16%; 74,93%, respectivamente). No entanto, a maior variação interpopulacional foi verificada na sub-região Sul (25,0%) com seis populações, enquanto a sub-região Caparaó com 14 populações apresentou 17,84% da variação (Tabela 7).

Pela comparação entre pares de populações com base no  $F_{ST}$  (Tabela 8), apenas os pares AL3 x AL4 (0,008) e AL4 x GU1 (0,095) não foram significativos ( $P<0,05$ ), portanto apresentam pouca ou nenhuma diferenciação. Os  $F_{ST}$  significativos variaram de 0,072 (JM1 x MI2) a 0,307 (IB2 x MI1). Na região Caparaó os valores encontrados variaram de 0,083 (IB2 x IB3) a 0,263 (IB2 x GU1), e na região Sul de 0,072 (JM1 x MI2) a 0,242 (MI1 x MU1) (Tabela 8).

A análise do número absoluto de migrantes (Tabela 8) entre os pares de populações com  $F_{ST}$  significativo ( $P<0,05$ ) variou de 1,127 (IB2 x MI1) a 6,451 (JM1 x MI2) com média de 3,690. Na região Caparaó variou de 1,304 (AL5 x GU4) a 5,759 (GU3 x GU4) com média de 4,052. Na região Sul, variou de 1,561 (MI1 x MU1) a 6,451 (MI2 x JM1) com média de 3,328, indicando a maior possibilidade de fluxo entre as populações da região Caparaó (Tabela 8).

Foi construído um dendrograma pela matriz de distâncias genéticas de NEI (1978) pelo critério de agrupamento UPGMA. A estimativa de correlação cofenética foi alta (0,81) e foram observados três grupos. As quatro populações de Guaçuí (GU1, GU2, GU3, GU4) e uma população de Alegre (AL1) formaram um grupo (G1). Quatro populações de Alegre (AL3, AL5, AL7 e AL4) e duas de Mimoso do Sul (MI1 e MI4) formaram outro (G2). O último grupo foi formado por duas populações de Alegre (AL6 e AL2), duas de Mimoso do Sul (MI3 e MI2) e as três de Ibitirama (IB1, IB2 e IB3) e a população de Muqui (MU1) (G3) (Figura 4). Todos os grupos foram formados por populações de mais de uma localidade, no entanto, o grupo G1 foi constituído por populações principalmente da mesma origem geográfica. Dois grupos foram formados por duas localidades e o grupo G3 formado por cinco localidades.

A avaliação feita pelo programa STRUCTURE v 2.2 (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2007) obteve o número de  $K=3$ . À medida que o  $K$  aumenta percebe-se que as populações partilham ainda mais alelos. Percebe-se a existência

de populações com indivíduos que compartilham características com outras populações, por exemplo, as populações AL1, que possuem indivíduos que apresentam alta diversidade, por outro lado a população AL4 mesmo apresentando características partilhadas pode-se perceber mais homogeneidade (Figura 5).

**Tabela 6-** Índices de diversidade genética baseados nas frequências alélicas de 13 *loci* microssatélites.

Grupo	$F_{ST}$	$G_{ST}$	$R_{ST}$	$F_{IT}$	$F_{IS}$
Todas (20)	0,18**	0,17	0,23	0,47**	0,35**
Sub-Região Sul (6)	0,19**	0,15	0,21	0,46**	0,33**
Sub-Região Caparaó (14)	0,17**	0,14	0,21	0,48**	0,37**

\*\*Significativo ( $P < 0,01$ ).  $F_{ST}$ , divergência genética dentro de populações;  $G_{ST}$  (múltiplos alelos) e  $R_{ST}$  (assume modelo “passos de mutação”), ambas são análogas ao  $F_{ST}$ ;  $F_{IT}$ , índice de fixação total;  $F_{IS}$ , índice de fixação dentro das populações.

**Tabela 7-** Resultado da AMOVA para análise de estrutura genética de populações com dois e três níveis hierárquicos e Análises dentro de cada sub-região

**Dois níveis hierárquicos**

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Componentes de variação	Índice de fixação	Variação (%)
Entre populações	19	278,84	0,73	$\Phi_{IS}$ : 0,19**	19,36
Dentre populações	300	910,83	3,04		80,64
Total	319	1189,67	3,77		

**Três níveis hierárquicos**

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Componentes de variação	Índice de fixação	Variação (%)
Entre populações	19	351,46	0,87	$\Phi_{IS}$ : 0,35**	17,79
Entre indivíduos dentre populações	140	710,31	1,41	$\Phi_{ST}$ : 0,18**	28,98
Dentre indivíduos	160	394,00	2,59	$\Phi_{IT}$ : 0,47**	53,23
Total	319	1455,77	4,87		

**Análise dentro da sub-região Sul**

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Componentes de variação	Índice de fixação	Variação (%)
Entre populações	5	36,22	0,45	$\Phi_{IS}$ 0,25**	25,07
Dentre populações	74	98,87	1,34		74,93
Total	79	135,09	1,78		

**Análise dentro da sub-região Caparaó**

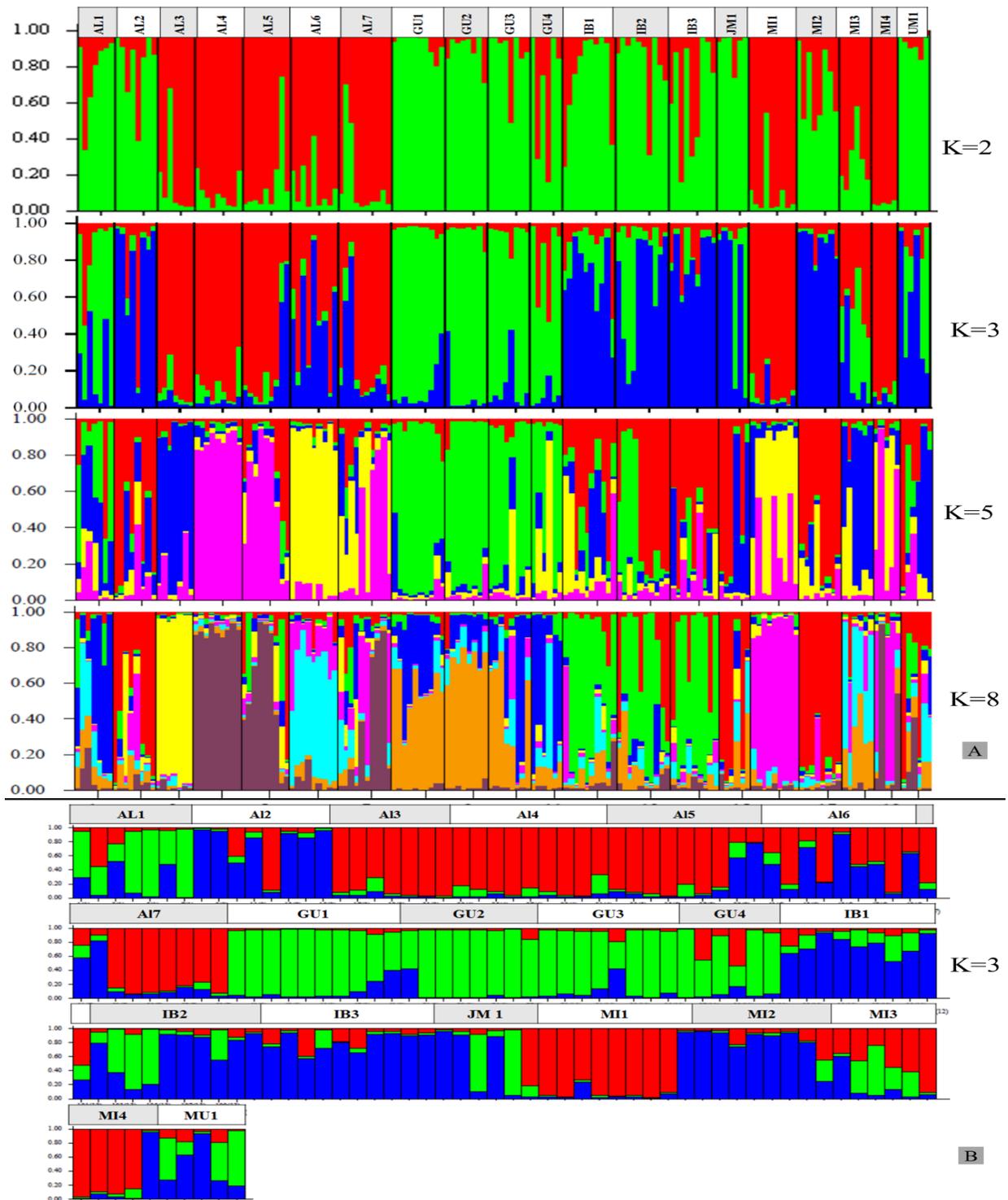
Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Componentes de variação	Índice de fixação	Variação (%)
Entre populações	13	178,18	0,63	$\Phi_{IS}$ 0,18**	17,84
Dentre populações	226	656,89	2,91		82,16
Total	239	835,08	3,54		

\*Significativo ( $P > 0,01$ ).

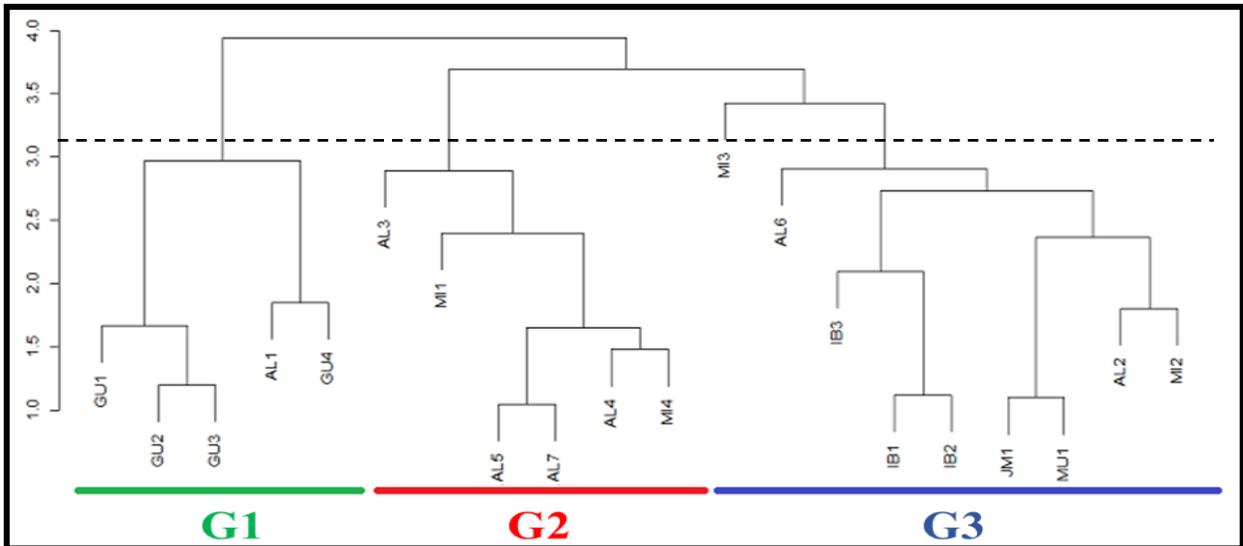
**Tabela 8-** Matriz de pares de FST (WEIR; HILL, 2002) entre populações (diagonal inferior) e número absoluto de migrantes (M=2Nm) entre populações (diagonal superior) estimado com base em FST.

	AL1	AL2	AL3	AL4	AL5	AL6	AL7	GU1	GU2	GU3	GU4	IB1	IB2	IB3	JM1	MI1	MI2	MI3	MI4	MU1
AL1		1,373	2,024	2,331	1,494	1,743	1,864	1,455	1,723	1,927	2,069	1,722	1,403	2,974	2,118	1,442	1,248	1,366	1,562	1,196
AL2	0,267*		2,328	2,643	2,787	4,500	1,932	3,579	1,460	2,230	1,566	2,547	2,208	1,963	3,992	1,500	2,238	2,029	1,851	2,049
AL3	0,198*	0,177*		65,577	3,369	3,922	2,107	2,804	2,289	3,225	2,858	3,111	2,334	3,815	4,933	1,744	3,252	1,520	1,991	1,605
AL4	0,177*	0,159*	0,008		2,174	3,276	1,970	4,784	1,713	2,927	2,442	3,891	1,871	3,603	3,851	1,145	2,215	1,461	1,486	1,630
AL5	0,251*	0,152*	0,129*	0,187*		4,796	2,480	1,891	1,322	1,672	1,304	1,544	1,561	2,326	2,866	1,587	1,967	1,472	2,519	1,665
AL6	0,223*	0,100*	0,113*	0,132*	0,094*		4,684	3,546	1,565	3,236	2,591	2,863	1,961	2,484	3,780	1,422	1,767	1,615	1,771	1,908
AL7	0,212*	0,206*	0,192*	0,202*	0,168*	0,096*		1,660	1,461	2,465	1,941	2,004	1,434	1,843	3,675	1,810	1,634	1,815	1,556	1,514
GU1	0,256*	0,123*	0,151*	0,095	0,209*	0,124*	0,231*		1,500	3,479	2,016	3,045	1,400	1,859	2,197	1,365	1,626	1,482	1,274	2,255
GU2	0,225*	0,255*	0,179*	0,226*	0,275*	0,242*	0,255*	0,250*		1,774	1,568	1,500	1,794	1,992	3,295	1,626	1,448	1,353	1,496	1,149
GU3	0,206*	0,183*	0,134*	0,146*	0,230*	0,134*	0,169*	0,126*	0,220*		5,759	5,674	2,053	2,734	3,635	1,865	2,444	2,304	2,403	2,266
GU4	0,195*	0,242*	0,149*	0,170*	0,277*	0,162*	0,205*	0,199*	0,242*	0,080*		4,913	1,544	2,056	2,813	1,423	1,768	1,905	1,869	1,463
IB1	0,225*	0,164*	0,138*	0,114*	0,245*	0,149*	0,200*	0,141*	0,250*	0,081*	0,092*		2,593	2,815	3,469	1,399	2,029	2,272	1,593	2,011
IB2	0,263*	0,185*	0,176*	0,211*	0,243*	0,203*	0,259*	0,263*	0,218*	0,196*	0,245*	0,162*		5,546	3,944	1,127	1,785	1,378	1,554	1,705
IB3	0,144*	0,203*	0,116*	0,122*	0,177*	0,168*	0,213*	0,212*	0,201*	0,155*	0,196*	0,151*	0,083*		4,694	1,362	3,035	1,857	2,605	1,791
JM1	0,191*	0,111*	0,092*	0,115*	0,149*	0,117*	0,120*	0,185*	0,132*	0,121*	0,151*	0,126*	0,113*	0,096*		3,197	6,451	4,324	4,627	2,732
MI1	0,257*	0,250*	0,223*	0,304*	0,240*	0,260*	0,216*	0,268*	0,235*	0,211*	0,260*	0,263*	0,307*	0,269*	0,135*		1,720	2,181	3,381	1,566
MI2	0,286*	0,183*	0,133*	0,184*	0,203*	0,221*	0,234*	0,235*	0,257*	0,170*	0,220*	0,198*	0,219*	0,141*	0,072*	0,225*		4,029	3,507	1,803
MI3	0,268*	0,198*	0,248*	0,255*	0,254*	0,236*	0,216*	0,252*	0,270*	0,178*	0,208*	0,180*	0,266*	0,212*	0,104*	0,187*	0,110*		4,227	1,705
MI4	0,242*	0,213*	0,201*	0,252*	0,166*	0,220*	0,243*	0,282*	0,251*	0,172*	0,211*	0,239*	0,243*	0,161*	0,098*	0,129*	0,125*	0,106*		1,740
MU1	0,295*	0,196*	0,238*	0,235*	0,231*	0,208*	0,248*	0,182*	0,303*	0,181*	0,255*	0,199*	0,227*	0,218*	0,155*	0,242*	0,217*	0,227*	0,223*	

\*Significativo (P > 0,05).



**Figura 4-** Gráficos obtidos pela análise no STRUCTURE, cada grupo é representado por uma cor, cada indivíduo por uma barra vertical. (A) Gráficos obtidos com K=2, K=3, K=4, K=4 e K=8, (B) detalhe de cada indivíduo assumindo K=3.



**Figura 5-** Dendrograma UPGMA de 20 populações de *E. edulis* usando a distância genética de Nei (1973).

Com base na análise de diversidade realizada através da distância de Nei (1978) e agrupamento UPGMA e ainda pelos resultados obtidos pelo software STRUCTURE verificou-se a concordância de formação de três grupos. Assim, com base nesses grupos formados foram realizadas novas análises: AMOVA; índices de diversidade genética; equilíbrio de Hardy-Wenber; matriz  $F_{ST}$ , e número absoluto de migrantes.

A maior variação continuou dentre populações, no entanto quando considerado 20 populações a variação dentre era 19,36%, considerando as três populações a variação diminuiu entre (8,94%) e conseqüentemente aumentou dentre (91,07%) (Tabela 9). Esse resultado corrobora com a baixa diferenciação entre populações obtidas pelos índices de diversidade ( $F_{ST}= 0,08$ ;  $G_{ST}= 0,04$ ;  $R_{ST}= 0,08$ ), resultado diferente do obtido pelas 20 populações que foi moderado (Tabela 10). Todos os *loci* e todas as populações se encontram em equilíbrio de Hardy-Wenber (Tabela 11). Todos os pares pela matriz de  $F_{ST}$  foram significativos, e a média de migrantes foi de 6,47 (Tabela 12).

**Tabela 9-** Resultado da AMOVA para análise de estrutura genética de populações com dois níveis hierárquicos e Análises dentro de cada região

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Componente de variação	Índice de fixação	Varição (%)
Entre populações	2	14,382	0,115	$\Phi_{SF}$ 0,089**	8,939
Dentre populações	157	183,298	1,168		91,061
Total	159	197,680	1,282		100

\*\*Significativo ( $P < 0,01$ ).

**Tabela 10-** Índices de diversidade genética baseados nas frequências alélicas de 13 *loci* microssatélites.

Grupo	$F_{ST}$	$R_{ST}$	$G_{ST}$	$F_{IT}$	$F_{IS}$
K=3 STRUCTURE	0,08**	0,08	0,04	0,47**	0,44**

\*\*Significativo ( $P < 0,01$ ).  $F_{ST}$ , divergência genética dentro de populações;  $G_{ST}$  (múltiplos alelos) e  $R_{ST}$  (assume modelo “passos de mutação”), ambas são análogas ao  $F_{ST}$ ;  $F_{IT}$ , índice de fixação total;  $F_{IS}$ , índice de fixação dentro das populações.

**Tabela 11-** Probabilidade do Teste Exato de Fisher para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, em 3 grupos de *Eutrype edulis* M. com base em microssatélites.

<i>Loci</i>	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
EE2	1,00	1,00	1,00
EE3	1,00	1,00	1,00
EE5	1,00	1,00	1,00
EE8	1,00	1,00	1,00
EE9	1,00	1,00	1,00
EE15	0,99	0,84	0,99
EE32	1,00	1,00	1,00
EE41	1,00	1,00	1,00
EE43	0,76	1,00	1,00
EE45	0,53	1,00	1,00
EE47	1,00	0,96	1,00
EE54	1,00	1,00	1,00
EE63	1,00	1,00	1,00

**Tabela 12-** Matriz de pares de  $F_{ST}$  (WEIR; HILL, 2002) entre populações (metade inferior) e número absoluto de migrantes ( $M=2Nm$ ) entre populações (metade superior) estimado com base em  $F_{ST}$ .

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1		5.47107	7.78757
Grupo 2	0.08374*		6.14919
Grupo 3	0.0752*	0.06033*	

\*Significativo a  $P > 0,05$ .

## 5 DISCUSSÃO

Os marcadores microssatélites avaliados foram eficientes na detecção da variabilidade genética. O PIC foi maior que 0,55, indicativo de que os SSR foram altamente informativos (BOTSTEIN et al., 1980) (Tabela 3). Em outros trabalhos realizados com espécies da mesma família (Arecaceae) foram encontrados valores semelhantes de PIC: *Elaes quineensis*: PIC = 0,53 (SINGH et al., 2008); *Elaeis oleifera*: PIC = 0,40 (ZAKI et al., 2012) (Tabela 3).

A divergência genética encontrada (média da  $H_E = 0,60$ ) (Tabela 3), foi inferior aos valores descritos para a mesma espécie em outras regiões ( $H_E=0,781-0,785$ , CONTE et al, 2008;  $H_E=0,86$ , GAIOTTO et al, 2003) e semelhante ou superior aos detectados em estudos realizados com espécies da mesma família: *Phoenix carariensis*:  $H_E = 0,27 - 0,62$  (SARO et al, 2015); *Chanaeropshimilus* L.:  $H_E = 0,01 - 0,39$  (GIOVINO et al, 2014). Tais resultados mostram que os SSR utilizados neste trabalho para estimar a diversidade e estrutura genéticas estão dentro do padrão encontrado para Arecaceae.

Quanto à diversidade genética dentro de populações, todas apresentaram proporção de  $H_O$  menor que em relação ao esperado em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Em relação ao  $f$  positivo observado sugere-se endogamia com excesso de homozigotos. A diferença entre  $H_E$  e  $H_O$  foi baixa (0,20 em média) indicando que ainda existe variabilidade genética razoável (Tabela 4). Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Conte et al., (2006), onde o valor médio de  $H_O$  também foi menor que o de  $H_E$  ( $H_O=0,378$ ;  $H_E=0,403$ ) para *E. edulis* e  $f$  foi positivo em todas as populações.

As sub-regiões Sul e Caparaó apresentaram valores médios semelhantes dos parâmetros descritivos da população:  $n$ ,  $A/LoCo$ ,  $H_O$ ,  $H_E$ ,  $f$ . No entanto, é necessário considerar que mesmo sendo diferença pequena, existem populações com conjunto de indivíduos que apresentaram maior diversidade genética, tais diferenças podem representar muito para a futura adaptação de populações principalmente com níveis baixos de diversidade genética entre indivíduos (DINIZ-FILHO et al., 2012). Na região Caparaó foram verificadas as populações que obtiveram os maiores valores para três dos parâmetros calculados ( $n$ ,  $A/LoCo$ ,  $H_E$ ) e menores valores de  $f$ , sendo que AL7

obteve altos valores nos parâmetros,  $n$ ,  $A/LoCo$ ,  $H_o$ ,  $H_E$  e terceiro menor  $f$ , indicando que essa população comporta alta variabilidade genética entre seus indivíduos, e a GU4 apresentou menor homoziguidade ( $f = 0,08$ ) (Tabela 4).

Em relação a alelos privados houve a ocorrência de poucos (apenas três). A espécie produz palmito comestível muito apreciado para alimentação e não perfilha (LIMA et al., 2008), isso pode ter submetido a espécie a gargalos genéticos. Tal processo pode reduzir severamente o número de alelos presentes, sendo os alelos raros perdidos mais rapidamente (MARUYAMA; FUERST, 1985; ALLENDORF, 1986; FREELAND, 2005).

Com base nos resultados citados acima as populações apresentam-se endogâmicas, no entanto a espécie *E. edulis* é alógama, com protandria acentuada (MANTOVANI; MORELLATO, 2000) e taxas de fecundação cruzada próximas de 1,0 (REIS, 1996; CONTE, 2008; GAIOTTO, 2003). Essa endogamia pode ser explicada pela fragmentação florestal que pode diminuir o fluxo gênico entre populações e conseqüentemente aumentar o cruzamento entre indivíduos geograficamente próximos e aparentados. Outra forma de explicar a endogamia é a elevada produção anual de frutos (REIS, 1995; MANTOVANI; MORELLATO, 2000) que ocasiona a formação de um banco de plântulas logo abaixo da copa (REIS, 1995; REIS et al., 2000), estes por ventura podem chegar a fase adulta diminuindo a possibilidade de cruzamentos aleatórios e facilitando o cruzamento entre indivíduos aparentados.

A ocorrência de endogamia, pode reduzir os níveis de adaptação e desempenho dos indivíduos, diminuindo todas as medidas de diversidade genética através do aumento das taxas de mortalidade (FREELAND, 2005). Essa situação pode resultar na extinção destas populações, em que a existência de baixa variabilidade genética diminui a adaptação a diferentes condições ambientais. Para a sobrevivência da espécie é necessário que os indivíduos se reproduzam por cruzamentos, assim, é imprescindível que os polinizadores da espécie estejam presentes na área, para que ocorram cruzamentos entre indivíduos não aparentados. Porém, a fragmentação florestal causa dificuldade no tráfego de polinizadores e dispersores. O polinizador mais abundante observado em flores de palmito juçara é a espécie *Trigona spinipes*, uma pequena abelha (REIS et al., 2000). O fruto de *E. edulis* é atrativo para um grande

número de dispersores, que podem ser aves, mamíferos e roedores (REIS; KAGEYAMA, 2000; FADINI et al., 2009). Devido ao impacto que a fragmentação florestal pode estar causando é necessário elaboração de estratégias de conservação, uma opção seria a manutenção de áreas naturais, áreas de plantios e corredores ecológicos próximos a estas.

De modo geral, a diversidade genética entre as 20 populações foi moderada ( $F_{ST}=0,18$ ;  $G_{ST}=0,17$ ). Foram encontrados valores muito próximos entre as sub-regiões Sul e Caparaó, mas, a Caparaó obteve menor valor ( $F_{ST}=0,17$ ;  $G_{ST}=0,14$ ) que na região Sul ( $F_{ST}=0,19$ ;  $G_{ST}=0,15$ ) (Tabela 6). Valores de diversidade entre populações, mais baixos que o encontrado neste trabalho para esta espécie foram reportados por: GAIOTTO *et al.* (2003) com  $F_{ST} = 0,06$ ; e CONTE *et al.* (2006) com  $G_{ST} = 0,024, 0,021$  e  $0,028$ ). Estas diferenciações encontradas de baixas a moderadas entre populações neste trabalho e em outros na literatura podem ser devido à presença de elevados a moderados níveis de fluxo gênico histórico entre populações (FUCHS; HAMRICK, 2010) associado a migrações entre regiões.

O número considerável de migrantes por geração estimado entre as populações variou de 1,145 (JM1 x MI1) a 6,578 (JM1 x MU1), o que indica que ocorreu no passado fluxo gênico entre estas e outras populações (Tabela 8). Entretanto, considerando que a espécie possui ciclo de vida longo, os locais de coleta podem ter passado por intensas transformações (SCOLFORO; CARVALHO, 2006; NERI et al., 2011). Portanto, este retrato do fluxo gênico histórico pode não condizer com a situação atual de fluxo gênico entre estas populações.

A AMOVA realizada com todas as populações e para cada região manteve a maior diferenciação intrapopulacional (80,64; 53,23; 74,93; e 82,16, respectivamente). A maior variação interpopulacional foi verificada na região Sul (25,07) com seis populações, diferente da região Caparaó (17,84) com 14 populações (Tabela 7). Em estudos realizados com a mesma espécie da mesma família obteve maior diferenciação dentro de populações com valores semelhantes ao encontrado no presente trabalho: *Euterpe oleraceae*: AMOVA dentro de populações = 75,85% (OLIVEIRA; SILVA, 2008); *Hyophorbe lagenicaulis* AMOVA dentro de = 70% (ASMUSSEN-LANGE et al., 2011).

As populações analisadas encontram-se moderadamente estruturadas, de

acordo com os valores de  $F$  (Tabela 6). O  $F_{IT}$  foram próximos entre as regiões, no entanto a sub-região Sul com menos populações e indivíduos obteve maior valor ( $F_{IT}$  Sul = 0,46;  $F_{IT}$  Caparaó = 0,48), indicando menor homoziguidade, corroborado com a alta diferenciação intrapopulacional para Sul ( $F_{IT}$  = 0,25) e moderada para Caparaó ( $F_{ST}$  = 0,18) (Tabela 6). A situação da estrutura genética em *E. edulis* observada neste estudo pode estar ocorrendo em decorrência de vários fatores, entre eles fragmentação florestal, heterogeneidade ambiental, densidade populacional, morfologia floral, sistema reprodutivo, mecanismos de polinização e dispersão de sementes (LOVELESS; HAMRICK, 1984; HEYWOOD, 1991; HAMRICK et al., 1993; MANEL et al., 2003; VEKEMANS; HARDY, 2004). Pode ser também que os locais de amostragem das populações em períodos remotos tenham um fluxo gênico contínuo de modo que as populações ainda não foram diferenciadas o suficiente para formar grupos distintos, e mesmo que reduzido ainda pode estar ocorrendo migração entre estas regiões. As distâncias geográficas podem ser observadas no mapa na Figura 1 onde existem populações próximas e distantes, e em alguns casos essas distâncias também são superadas por mecanismos de dispersão entre outros.

A formação de grupos pela análise do STRUCTURE foi corroborada pelo dendrograma construído através das distâncias de Nei. As populações formaram três grupos de populações genéticas (Figura 5). O agrupamento revelou a existência de padrão definido de relações geográficas e diversidade genética para algumas populações, estas foram as coletas realizadas em Guaçuí onde as quatro populações ficaram no mesmo grupo junto com uma população de Alegre (AL1), sendo que esta é próxima às de Guaçuí. As populações de Ibitirama ficaram no mesmo grupo, no entanto elas ficaram juntas com duas de Alegre e de Mimoso do Sul e com uma população de Jerônimo Monteiro e de Muqui. Este fato não pode ser explicado geograficamente, visto que se encontram muito distantes uma da outra, sendo que a maior distância territorial considerada nesse estudo foi entre IB1 e MU1 (Figura 1). O maior grupo foi formado por quatro populações de Alegre e duas de Mimoso do Sul, a maioria dessas populações se encontram próximas e outras afastadas.

As amostras de Alegre foram as únicas que fizeram parte de todos os grupos. Não foi obtido agrupamento com base nas sub-regiões Sul e Caparaó. As populações

da sub-região Caparaó ficaram em todos os grupos, e a região Sul em dois grupos. Desse modo foi observada semelhança entre algumas populações próximas e algumas adjacentes.

No STRUCTURE foram obtidas ( $K=3$ ) as populações com maior diversidade AL1, MI3 e MU1 (Figura 5A). Também se observa populações mais semelhantes como AL3, AL4, AL5, GU1, GU2, MI2 em que nos indivíduos das mesmas populações prevaleceu a mesma cor. Esta análise mostrou que para a conservação genética há, pelo menos, três sítios com alta diversidade e diferenciação genética (Figura 5).

## 6 CONCLUSÃO

A espécie *E. edulis* apresentou excesso de homozigotos em todas as populações e a diversidade e estrutura genética entre população se encontram moderadas, e não há grandes diferenças entre a sub-regiões Sul e Caparaó.

A análise de diversidade demonstrou através do agrupamento que as populações foram estruturadas em três grupos, e nestes contendo mais de uma localidade. A variabilidade genética encontrada nas populações, mostra que os processos de fragmentação florestal e o extrativismo da espécie no Espírito Santo estão causando um processo de perda de diversidade. A endogamia encontrada nas populações tende a aumentar em próximas gerações, sendo um fator preocupante, pois pode favorecer a deriva genética e levar a depressão por endogamia.

A alta endogamia possivelmente é devido aos indivíduos que vivem no entorno serem aparentados. Uma solução para a baixa proporção de heterozigosidade observada é a reprodução cruzada entre diferentes populações, proporcionando manutenção e monitoramento de áreas de ocorrência da espécie, com manejo para a conservação e corredores ecológicos.

Verificou-se a necessidade de políticas públicas para induzir a conservação e restauração da variabilidade genética de *E. edulis*, por exemplo através reservas ecológicas em áreas mais relevantes e restauração florestal.

A população que apresentou menos homozigotos foi GU4, e que apresentou maior divergência foi AL7.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, I.; ISLAM, M.; ARSHAD, W.; MANNAM, A; AHMAD, W; MIRZA, B. High-quality plant DNA extraction for PCR: An easy approach. **Journal of Applied Genetics**, v. 50, p. 105-107, 2009.

ALLENDORF, F. W. Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. **Zoo Biology**, v. 5, n. 2, p. 181-190, 1986.

ALMEIDA-SCABBIA, R. J. Fitossociologia de um trecho de Floresta Atlântica no Parque Estadual Intervales, SP. Rio Claro, SP.M.Sc. **Tese, Universidade Estadual Paulista**, Rio Claro, Brazil, 1996.

ASIF, M. J.; CANNON, H. DNA extraction from processed wood – a case study for the identification of an endangered species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 23, p. 185–192, 2005.

ASMUSSEN-LANGE, C. B.; MAUNDER, M.; FAY, M. F. Conservation genetics of the critically endangered Round Island bottle palm, *Hyophorbe lagenicaulis* (Arecaceae): can cultivated stocks supplement a residual wild population? **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 167, p. 301–310, 2011.

ASMUSSEN-LANGE, C. B.; MAUNDER, M.; FAY, M. F. Conservation genetics of the critically endangered Round Island bottle palm, *Hyophorbe lagenicaulis* (Arecaceae): can cultivated stocks supplement a residual wild population? **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 167, p. 301–310, 2011.

BARRETT, S. C. H.; KOHN, J. R. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. **Genetics and conservation of rare plants**, p. 3-30, 1991.

BECKMANN-CAVALCANTE, M. Z.; PIVETTA, K. F. L. Temperatura, escarificação mecânica e substrato na germinação de sementes das palmeiras juçara e açaí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 7, n. 4, p. 569-573, 2012.

BHARGAVA, A.; FUENTES, F. F. Mutational dynamics of microsatellites. **Molecular Biotechnology**, v. 44, p. 250–266, 2010.

BICUDO, M. O. P.; RIBANI, R. H. Anthocyanins, phenolic acids and antioxidant properties of juçara fruits (*Euterpe edulis* M.) along the on-tree ripening process. **plant foods hum nutr journal**, v. 69, p. 142–147, 2014.

BIODIVERSITAS. **Espécies ameaçadas on line**. Disponível em: <<http://www.biodiversitas.org.br/floraBr/>>. Acesso em: 24 de janeiro de 2013.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage in man using restriction fragment length polymorphism. **The American Journal**

of **Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.

BRANCALION, P. H.S.; VIDAL, E.; LAVORENTI, N. A.; BATISTA, J. L. F.; RODRIGUES, R. R. Soil-mediated effects on potential *Euterpe edulis* (Arecaceae) fruit and palm heart sustainable management in the Brazilian Atlantic Forest. **Forest Ecology and Management**, v. 284, p. 78–85, 2012.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 6. **Lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção**. Diário Oficial da União de 23 de setembro de 2008, (Seção 1) 185, p.75-83.

BRITO, E. S.; ARAÚJO, M. C. P.; ALVEZ, R. E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B. A.; NOVOTNY, J. A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9389–9394, 2007.

BROQUET T, PETIT E. J. Molecular estimation of dispersal for ecology and population genetics. **Revisão Anual de Ecologia , Evolução**, v. 40, p. 193–216, 2009.

CASTRO, E. R. **Fenologia reprodutiva do palmito *Euterpe edulis* (Arecaceae) e sua influência na abundância de aves frugívoras na Floresta Atlântica**. Rio Claro, 183f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

CHENG, F. S.; BROWN, S. K.; WEEDEN, N. F. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species. **Hort Science**, v. 32, p. 921–922, 1997. **Chromatographia**, v. 59, n. 11/12, p. 739–743, 2004.

CINGILLI, H. AKÇIN, A. High quality DNA isolation method for chickpea genotypes. **Turkish Journal of Biology**, n. 29, p. 1–5, 2005.

COISSON, J. D.; TRAVAGLIA, F.; PIANA, G.; CAPASSO, M.; ARLORIO, M. *Euterpe* oleracea juice as a functional pigment for yogurt. **Food Research International**, v. 38, p. 893–897, 2005.

CONTE, R.; REIS, M. S.; MANTOVANI, A.; VENCOVSKY, R. Genetic Structure and Mating System of *Euterpe edulis* Mart. Populations: A Comparative Analysis Using Microsatellite and Allozyme Markers. **Journal of Heredity**, v. 5, p. 476–482, 2008.

CONTE, R.; REIS, M. S.; VENCOVSKY, R. Effects of management on the genetic structure of *Euterpe edulis* Mart. populations based on microsatellites. **Scientia Forestalis**, v. 81, n. 72, p. 81-88, 2006

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. v.35, n.3, p.271-276, 2013.

ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and

carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n.22, p. 9135-3141, 2007.

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

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

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

EXCOFFIER, L.; HECKEL. Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. **Nature**, v. 7, p. 745-758, 2006.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. ARLEQUIN version 3.01: an integrated software package for population genetics data analysis. **Bern: University of Bern, Zoological Institute**, 2006

FADINI, R. F.; FLEURY, M.; DONATTI, C. I.; GALETTI, M. Effects of frugivore impoverishment and seed predators on the recruitment of a keystone palm. **Acta Oecologica**, v.35, p.188–196, 2009.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**. v. 7, p. 574–578, 2007

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 3 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.

FINKELDEY, R.; LEINEMAN, L.; GAILING, O. Molecular genetic tools to infer the origin of forest plants and wood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1251-1258, 2010.

FREELAND, J. R. **Molecular Ecology**. John Wiley & Sons Ltd., 2005. 403p.

FUCHS, E. J.; HAMRICK, J. L. Spatial genetic structure within size classes of the endangered tropical tree *Guaiaacum sanctum* (Zygophyllaceae), **American Journal of Botany**, v. 97(7), p. 000–000, 2010.

GAIOTTO, F. A.; BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for heart of palm – *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Arecaceae). **Molecular Ecology**, v. 1, n. 1, p. 86-88, 2001.

GAIOTTO, F. A.; GRATTAPAGLIA, D.; VENCOSKY, R. Genetic structure, mating

system, and long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). **Journal of Heredity**, v. 5, p. 399–406, 2003.

GALLORI, S.; BILIA, A. R.; BERGONZI, M. C.; BARBOSA, W. L. R.; VINCIERI, F. F. Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (açai palm). **Chromatographia**, v. 59, n. 11, p. 739-743, 2004.

GIOVINO, A.; SCIBETTA, S.; SAIA, S.; GUARINO, C. Genetic and morphologic diversity of European fan palm (*Chamaerops humilis* L.) populations from different environments from Sicily. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.176, p. 66–81, 2014.

GOUDET J. FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics, 1995.

GUIDUGLI, M. C. Genetic characterization of 12 heterologous microsatellite markers for the giant tropical tree *Cariniana legalis* (Lecythidaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v 33, n.1, p. 131-134, 2010.

HAJJAR, R.; JARVIS, D.I.; GEMMILL-HERREN, B. The utility of crop genetic diversity in maintaining ecosystem services. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, n. 123, p. 261–270, 2008.

HAMRICK; J. L.; MURASWSKI, D. A.; NASON, J. D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. **Vegetation**, v.107/108, p.281-297, 1993.

HEYWOOD. J. S. Spatial analysis of genetic variation in plant populations. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.22, p.335-355, 1991.

HUFFORD, K. M.; MAZER, S. J. Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. **TRENDS in Ecology and Evolution**, v. 18, n. 3, p. 147-154, 2003.

IBGE. Instituto Brasileiro de Florestas. **Bioma Mata Atlântica**. 2014. Disponível em: < <http://www.ibflorestas.org.br/bioma-mata-atlantica.html> >. Acesso em 13 de fev. 2015

ICMBIO. Ministério do Meio Ambiente. **Histórico do Parque Nacional do Caparaó**. 2010. Disponível em < [http://www4.icmbio.gov.br/parna\\_caparao/index.php?id\\_menu=92](http://www4.icmbio.gov.br/parna_caparao/index.php?id_menu=92) >. Acesso em 03 de abr. 2013.

INÁCIO, M. R. C.; LIMA, K. M. G.; LOPES, V. G.; PESSOA, J. D. C.; TEIXEIRA, G. H. A. Total anthocyanin content determination in intact açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and palmiteiro-juçara (*Euterpe edulis* Mart.) fruit using near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate calibration. **Food Chem**, v. 136, p. 1160–1164, 2013.

JAMNADASS, R.; HANSON, J.; POOLE, J.; HANOTTE, O.; SIMONS, T. J.; DAWSON, I. K. High differentiation among populations of the woody legume *Sesbania sesban* in sub-Saharan Africa: implications for conservation and cultivation during germplasm

introduction into agroforestry systems. **Forest Ecology and Management**, n. 210, p. 225-238, 2005.

JARDIM, M. A. G. Possibilidade do cultivo do açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) em áreas de capoeira como alternativa para agricultores do nordeste do Nordeste Paraense. Museu Paraense Emílio Goeldi/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Relatório Técnico-Científico, **Journal of Heredity**, v. 86, p. 485–486, 2005.

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

KARACA, M.; INCE, A. G.; ELMASULU, S. Y; ONUS, A. N; TURGUT, K. Coisolation of genomic and organelle DNAs from 15 genera and 31 species of plants. **Analytical Biochemistry**, v. 343, p. 353–355, 2005.

LEWIS, P. O.; E ZAYKIN, D. **GDA** – Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>>. 2001

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C.; KNAPP, M. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio  $R_{Fd}$  of leaves with the PAM fluorometer. **Photosynthetica**, v. 43, n. 03, p. 379-393, 2005.

LIMA, L. S. H. Crescimento de mudas de *Euterpe edulis* Martius em resposta a diferentes doses de fósforo. **Ciência Florestal**, v. 18, n. 4, p. 461-470, 2008.

LORENZI, H. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo, 2006.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.15, p.65-95, 1984.

MAGNAGO, L. F.; EDWARDS, D. P.; EDWARDS, F. A.; MAGRACH, A.; MARTINS, S. V.; LAURANCE, W. F. Functional attributes change but functional richness is unchanged after fragmentation of Brazilian Atlantic forests. **Journal of Ecology**, n. 102, p. 475–485, 2014.

MANEL, S.; SCHWARTZ, M. K.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Landscape genetics: combining ecology and population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, v.18, n.4, p.189–197, 2003.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, P. Fenologia da floração, frutificação, mudança foliar e aspectos da biologia floral. **Sellowia**, v.49-52, p.23-38, 2000.

MARTINEZ, A.K.; GAITAN-SOLIS, E.; DUQUE, M.C.; BERNAL, R.; TOHME, J.

Microsatellite *loci* in *Bactris gasipaes* (Arecaceae): their isolation and characterization. **Molecular Ecology**, n.2, p. 408–410, 2002.

MARUYAMA, T.; FUERST, P. A. Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics II: Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. **Genetics**, v.111, p.675-689, 1985.

MISHRA, K. M.; RANI, S. N.; RAM, A.S.; SREENATH, H. L. A simple method of DNA extraction from coffee seeds suitable for PCR analysis. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 409-413, 2008.

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

NERI, A. V.; SOARES, M. P.; NETO, J. A. A. M.; DIAS, L. E. Espécies de Cerrado com potencial para recuperação de áreas degradadas por mineração de ouro, Paracatu, MG. **Revista Árvore**, v. 35, n. 4, 2011. p. 907-918.

OLIVEIRA, M. S. P.; SILVA, K. J. D. Diferenciação genética entre procedências de açaizeiro por marcadores RAPD e SSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 438-443, 2008.

OUBORG, J.; PERTOLDI, C.; LOESCHCKE, V, BIJLSMA, R. K.; HEDRICK, P. W. Conservation genetics in transition to conservation genomics. **Trends in Genetics**, v. 26, n.4, p.177-187, 2010.

PARK, N. I.; KIM, J. K.; PARK, W. T.; CHO, J. W.; PARK, S. U. An efficient protocol for genetic transformation of watercress (*Nasturtium officinale*) using *Agrobacterium rhizogenes*. **Molecular Biology Reports**, n. 38, p. 4947-4953, 2011.

PASAKINSKIENĖ, I.; PASAKINSKIENĖ, V. Floral meristems as a source of enhanced yield and quality of DNA in grasses. **Plant Cell Reports**, n. 18, p. 490–492, 1999.

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

REIS, A. Dispersão de sementes de palmitreiro (*E. edulis* M.-Palmae) na Floresta Ombrófila Densa Montana em Blumenau, SC. Campinas, 1995. 154p. Tese(Doutorado) – Universidade de Campinas.

REIS, A.; KAGEYAMA, P. Y. ***Euterpe edulis* Martius – (palmitreiro): biologia, conservação e manejo**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 202-224, 2000

REIS, A.; KAGEYAMA, P.; REIS, M.S.dos; FANTINI, A.C. Demografia de *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae) em uma Floresta Ombrófila Densa Montana, em Blumenau (SC). **Sellowia**, v.45-48, p.13-45, 1996.

REIS, M.S.; KAGEYAMA, P.Y. Dispersão de sementes de *Euterpe edulis* Martius. *Palmae. Sellowia*, v.49-52, p.60-92, 2000.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1141–1153, 2009.

RODRIGUES, R. R.; LIMA, R. A. F.; GANDOLFI, S.; NAVE, A. G. On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1242–1251, 2009.

SABLOK, G.; GAHLOT, P. GUPTA, A. K.; PAREEK, K. SHEKHAWAT, N. S. Extraction of PCR usable DNA from trees adapted to arid environment. **Plant OMICS: Journal of Plant Biology & Omics**, n. 2, p. 103–109, 2009.

SARO, I.; GONZÁLEZ-PÉREZ, M. A.; GARCÍA-VERDUGO C.; SOSA, P. Patterns of genetic diversity in Phoenix canariensis, a widespread oceanic palm (species) endemic from the Canarian archipelago. **Tree Genetics & Genomes**, p.11-815 2015.

SCOLFORO, J. R.; CARVALHO, L. M. T. **Mapeamento e inventário da flora nativa e dos reflorestamentos de Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 2006. 288p.

SEOANE, C. E. S. Efeitos da fragmentação florestal sobre o sistema de reprodução e a imigração de sementes em remanescentes populacionais de *Euterpe edulis* Martius. **Documentos**, Colombo-PR, n. 152, 2007.

SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; RIBEIRO, M.; REIS, M. S.; BAWA, A. M. Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Mart. **Revista do Instituto Florestal**, v. 17, n. 1, p. 25-43, 2005.

SILVA, S. P.; MAÊDA, J. M. PEREIRA, M. B.; JUNIOR, A. P. Divergência morfológica entre matrizes de *Euterpe edulis* Mart. **Floresta e Ambiente**, v. 12, n. 2, p. 65, 2006.

SINGH, R.; ZAKI, N. M.; TING, N. C.; ROSLI, R.; TAN S-G.; LOW, E. T. L.; ITHNIN, M.; CHEAH, S. C. Exploiting an oil palm EST database for the development of gene-derived SSR markers and their exploitation for assessment of genetic diversity. **Section Cellular and Molecular Biology**, v. 63/2, p. 227-235, 2008.

SINGH, V.; KUMA, V. An optimised method of DNA isolation from highly mucilage rich okra (*Abelmoschus esculentus* L.) for PCR analysis. **Pelagia Res Library**, v. 3, p. 1809–181, 2010.

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

SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**,

v.236, p.787-792, 1987.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numeral taxonomy**. San Francisco: W.H. Freeman, 1973.

SOS MATA ATLÂNTICA; INPE. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: Período 2005-2008**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica & INPE, p. 156, 2009.

STEFFAN, R. J.; GOKSOYR, J. BEJ, A. K.; ATLAS, R. M. Recovery of DNA from soils and sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 54, v. 12, p. 2908–2915, 1988.

SUFRAMA – Superintendência da Zona Franca de Manaus. **Potencialidades Regionais, Estudo de Viabilidade Econômica: Palmito de Pupunha**. Manaus, v.7, p. 36, 2013.

SZAJDEK, A.; BOROWSKA, E. J. Bioactive compounds and healthpromoting properties of berry fruits: a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 63, p. 147–156, 2008.

VARSHNEY, R. K; GRANER, A; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n.1, p. 48-55, 2005.

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, v.13, p.921-935, 2004.

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

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annual Eugenics**. v. 15, p. 223-354, 1951.

YOUNG, A.; BOYLE, T. Forest fragmentation. In: YOUNG, A.; BOYLE, T.; BOSHIER, D. (Ed.). **Forest conservation genetics**. Melbourne: CISRO, p. 123-132, 2000.

ZAKI, N. M.; SINGH, R.; ROSLI, R., ISMAIL, I. *Elaeis oleifera* Genomic-SSR Markers: Exploitation in Oil Palm Germplasm Diversity and Cross-Amplification in Arecaceae. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 4069-4088, 2012.

## APÉNDICE

# EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO DE DNA E AMPLIFICAÇÃO A PARTIR DO CÓRTEX DE *Euterpe edulis* Mart. (ARECACEAE)

## RESUMO

*Euterpe edulis*, uma espécie arbórea, de porte alto e de ocorrência natural em florestas apresenta dificuldade na coleta de folhas jovens, sadias e frescas, para obtenção de DNA genômico de boa qualidade, necessário para diferentes tipos de estudos de biologia molecular. Portanto, é necessário avaliar metodologias de extração de outros tipos de tecido que facilitem a coleta a campo de material biológico. Assim, este trabalho teve a proposta de avaliar a metodologia para obtenção de DNA de qualidade a partir do córtex do palmitero juçara. Foram utilizadas amostras retiradas do córtex de sete plantas adultas e folhas de sete mudas, a partir das quais foi feita a extração de DNA. Posteriormente foi realizada a quantificação por espectrofotometria e avaliação da qualidade e integridade do DNA em gel de agarose 0,8%. Para avaliar a qualidade do DNA na PCR foram realizadas reações de amplificação utilizando seis microssatélites. As razões A280/A260 nm variaram de 1,94 a 2,02 para folhas e de 1,90 a 1,97 para o córtex. Absorbâncias em proporções A260/A230 em folha variaram de 1,76 a 2,05 e de 1,96 a 2,03 no córtex. As concentrações de DNA em folha variaram de 81,9 a 310,1 ng/ $\mu$ L, e no córtex, de 105,2 a 404,8 ng/ $\mu$ L. A eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrou bandas de DNA genômico bem definidas, de elevado peso molecular e com pouca degradação. Os produtos amplificados obtidos por PCR apresentaram bandas definidas e claras para os dois materiais vegetais. A extração de DNA a partir de córtex foi eficiente, estabelecendo para a espécie um novo material por meio do qual se pode obter DNA genômico de igual qualidade, quantidade e integridade que o obtido de folhas.

**Palavras-chave:** palmitero juçara, estipe, isolamento de DNA, amplificação por PCR.

## INTRODUÇÃO

*Euterpe edulis* Martius, o palmitero juçara, é uma palmeira endêmica da Mata Atlântica, da qual se extrai o palmito que possui alto valor alimentício e comercial (LIMA et al., 2008). Esta palmeira produz grande quantidade de frutos (superior a 300.000 frutos ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>) (REIS; KAGEYAMA, 2000; FADINI et al., 2009), os quais possuem altos teores de compostos funcionais, como antocianinas que têm propriedades antioxidantes (BRITO et al., 2007; INÁCIO et al., 2013, COISSON et al., 2005; ROSSO; MERCADANTE., 2007; RUFINO et al., 2010). Antioxidantes retardam o envelhecimento e diminuem o risco de doenças crônicas, principalmente as cardiovasculares (SZAJDEK; BOROWSKA, 2008).

Marcadores moleculares são utilizados em estudos de genética de populações (KALIA et al., 2011), conservação de espécies, variação genética, estrutura e diferenciação de populações, fluxo gênico, história demográfica e eventos de hibridação (OUBORG et al., 2010). Para isto, protocolos de isolamento de DNA para diferentes espécies precisam ser avaliados (CINGILLI; AKÇIN, 2005) Um pré-requisito para as amplificações por PCR é a obtenção de DNA de qualidade e em quantidade satisfatórias (AHMED et al., 2009). Para isso, muitos seguem o princípio de se extrair DNA de folhas saudáveis e frescas (DOYLE; DOYLE, 1990; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Entretanto, este método torna-se difícil em plantas que atingem grande porte na fase adulta, como é o caso de *Euterpe edulis*, cujo indivíduo adulto atinge cerca de 30 m de altura (ALMEIDA-SCABBIA, 1996).

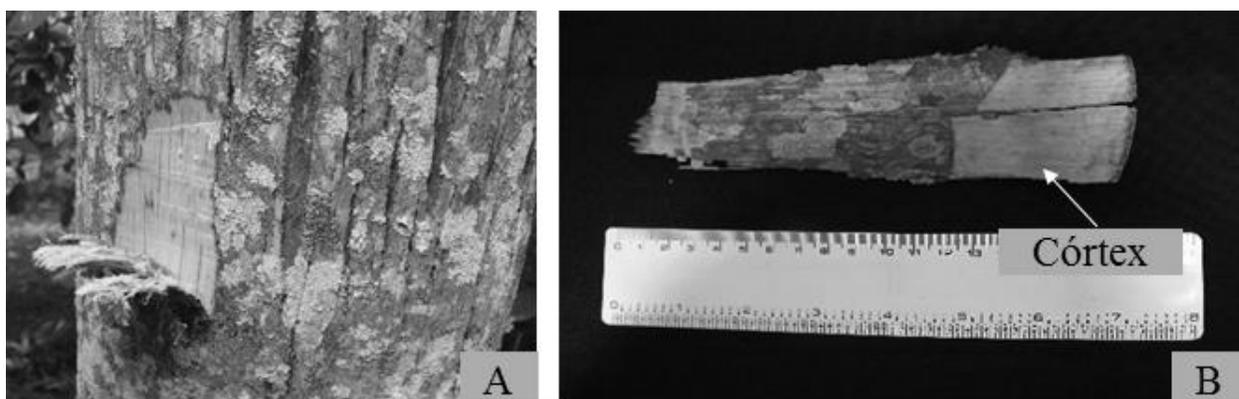
Uma alternativa para estas espécies seria o isolamento de DNA genômico a partir do caule, no entanto, este processo é considerado difícil devido à presença de proteínas, polissacarídeos e compostos fenólicos que atuam como fortes inibidores de extração de DNA (FINKELDEY et al., 2010).

Neste estudo foi realizada a extração de DNA a partir do córtex do palmitero juçara, que permitiu um isolamento de DNA de alta qualidade e quantidade adequada para análises moleculares, de forma comparativa ao DNA genômico extraído de folhas jovens.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Material vegetal

Foram utilizadas amostras retiradas do córtex de sete plantas adultas de *Euterpe edulis* em uma propriedade particular no município de Alegre - ES (Figura 1), e folhas juvenis foram obtidas a partir de mudas cultivadas em casa de vegetação. As amostras retiradas do córtex e as folhas foram colocadas em sacos de papel dentro de sacolas plásticas contendo sílica gel. Em seguida foi realizado o processo de extração de DNA.



**Figura 1:** Coleta de material para extração do DNA. (A) Estirpe. (B) Parte externa da amostra retirada da estirpe (seta indicando o córtex).

### Extração, quantificação e amplificação do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada seguindo protocolo baseado no método CTAB (Brometo de cetil-trimetil amônio) (DOYLE; DOYLE, 1990) modificado pelo CENARGEN (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A quantificação do DNA genômico foi realizada utilizando o espectrofotômetro *nanoDrop2000* (ThermoScientific). O rendimento foi determinado por medição da absorbância a 260, 280 e 230 nm. A pureza do DNA foi determinada pela razão 260/280 e 260/230. A integridade do DNA foi verificada em eletroforese em gel de

agarose 0,8% corado com 0,25 ug/ml de brometo de etídio em TBE 1X, e fotografados sob luz UV.

Em seguida foram amplificados microssatélites por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando seis *primers* SSR (Tabela 1) desenvolvidos e otimizados para *Euterpe edulis* por Gaiotto et al. (2001) (Tabela 1). A reação de volume de 13 µL foi composta de: 30 ng de DNA genômico; 1X de tampão 10 (phoneutria); 0,2 µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,25 mM dNTPs; e 1,2 U de Taq DNA polimerase. A reação foi realizada em termociclador (*Applied Biosystems*). O programa de amplificação foi de 94 °C por quatro minutos; 30 ciclos compostos por 94 °C por um minuto, temperatura de anelamento (específica de cada *primer*) por um minuto; 72 °C por um minuto; uma extensão final de 72 °C por 7 minutos.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em géis de agarose 1,5% em tampão TBE 1X a 90 volts, com duração aproximada de 2 horas. Também foram realizadas corridas em géis de poliacrilamida 6% em tampão TAE 1 X, a 100 volts, com duração de aproximadamente 3,30 horas. Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio (0,25 ug/ml) e fotografados por sistema de fotodocumentação.

**Tabela 1-** Informações sobre seis loci de microssatélites utilizados: loco, sequências dos primers, repetição de microssatélites, amplitude alélica em pares de base (pb) (A), temperatura de anelamento (TA).

SSR	Sequência 5' – 3'	Repetição	A	TA
EE8	F: GTATTCCAATGTGCTCACAG R: GTGCAGTAGGCTTCTAGTACC	(AG) <sub>20</sub>	98 - 127	58
EE23	F: GTTCTGCGATTCATACTCCTG R: TACGAACCAAGATGGAGCAA	(A) <sub>14</sub> (AG) <sub>23</sub>	100 - 123	58
EE32	F: CCGCCTGGTGAGCCTCT R: CAGTGCACCAAGGAACCTCAT	(AG) <sub>20</sub>	204-249	62
EE43	F: GCGAAAGGCTAACAACGTTAT R: AGCGAACCAACCAAGAAGAC	(AG) <sub>16</sub>	100 - 105	56
EE45	F: AAAGAAATTGGCGTGACATC R: AACCAGTCTTCTCCCTCTCG	(AG) <sub>28</sub>	100 - 151	56
EE47	F: CGAAATCAATGGTTTCAGTG R: AATTATTGTTGTGGGCAGC	(AG) <sub>20</sub>	220 - 236	56

Fonte: Gaiotto et al., 2001

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Euterpe edulis* é uma espécie que na fase adulta pode atingir cerca de 30 metros de altura (ALMEIDA-SCABBIA, 1996) dificultando a coleta de material foliar dos indivíduos em populações naturais. A obtenção de DNA genômico a partir da estirpe, viabiliza uma forma mais acessível de coleta de material vegetal em campo para a realização de estudos moleculares. Tal método é possível devido a *Euterpe edulis* se tratar de uma espécie herbácea, portanto só desenvolve crescimento primário, o que permite fazer um pequeno corte na estirpe a fim de retirar uma porção de córtex para obter material genômico ao invés de usar folha.

A razão A260/A280 (concentração de DNA em relação às proteínas) entre 1,8-2,0 indica um elevado grau de pureza (PASAKINSKIENĖ; PASAKINSKIENĖ, 1999). As razões A280/A260 nm variaram de 1,94 a 2,02 para folhas, e para o córtex variaram de 1,90 a 1,97 indicando a pureza do DNA em ambos os materiais.

A relação A260/A230 indica a contaminação da amostra com fenol ou outros compostos aromáticos: valores inferiores a 1,8 são indicativos de quantidades significativas de contaminantes (MANCHESTER, 1996; GLASEI, 1995; STEFFAN et al., 1988). A absorvância em proporções A260/A230 em folha variou de 1,76 a 2,05, e no córtex variou de 1,96 a 2,03 (Tabela 2) reafirmando a pureza do DNA e mostrando pouca diferença entre utilizar material foliar ou córtex. Tal resultado é importante porque a presença de polissacarídeos no DNA o torna viscoso, causando dificuldade de carregamento (SABLOK et al., 2009) e a contaminação também inibe a atividade da polimerase (KARACA et al, 2005; SINGH; KUMAR, 2010).

As concentrações de DNA em ng/uL mantiveram um padrão semelhante para ambos os materiais vegetais (em folha variaram de 81.9 a 310.1 ng/uL e no córtex de 105.2 a 404.8ng/uL). O protocolo utilizado permitiu obter DNA genômico sem contaminante a partir do córtex, mostrando pouca diferença em relação à folha.

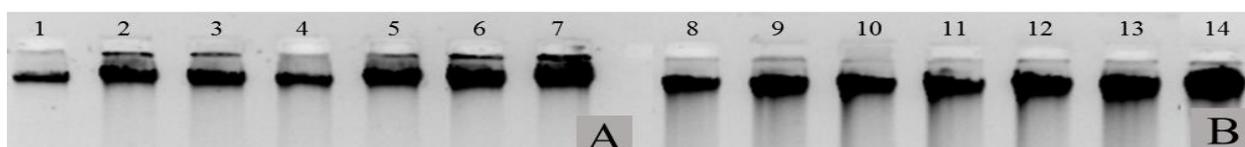
A eletroforese em gel de agarose (0,8%) mostrou bandas de DNA genômico bem definidas, de elevada massa molecular e sem arraste (Figura 1), indicando pureza e integridade.

Os DNAs extraídos tanto de folha quanto de córtex apresentaram um bom padrão de amplificação por PCR, pois as bandas resultantes foram bem definidas e

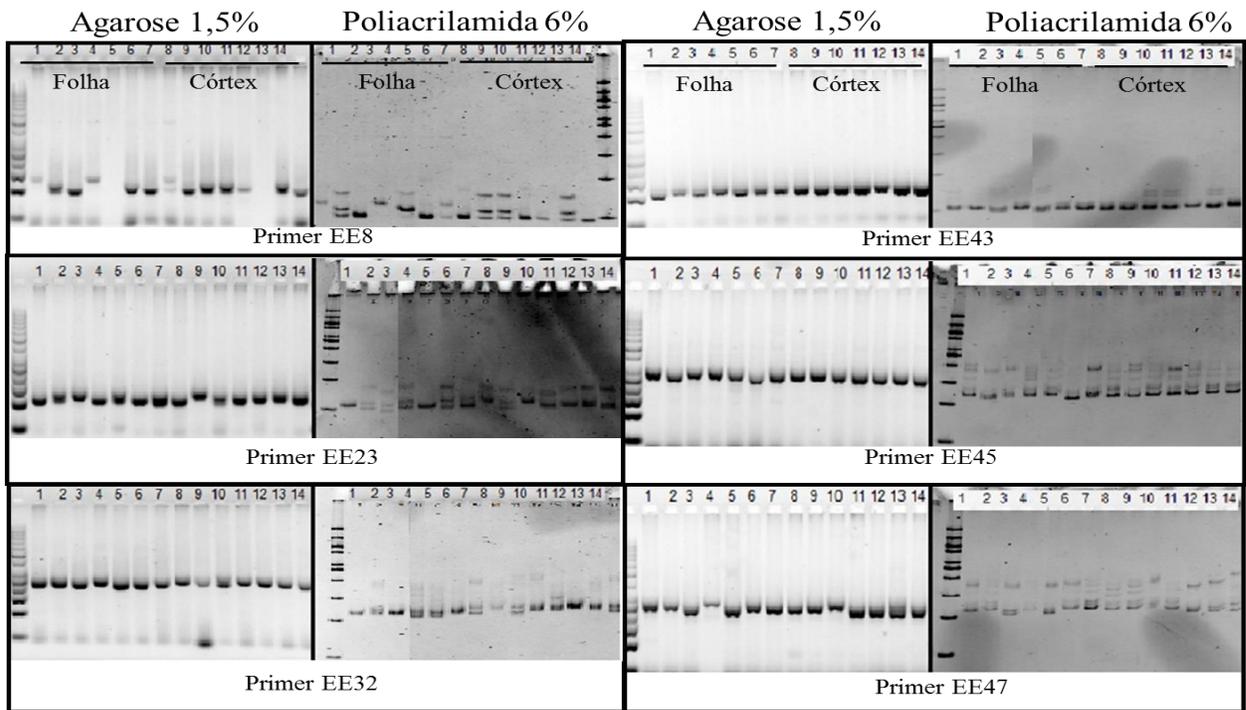
claras para os dois materiais, não mostrando diferença aparente, tanto em gel de agarose quanto em gel de poliacrilamida. Uma amplificação bem-sucedida de fragmentos de DNA por PCR é considerada mais adequada que a estimativa de espectrofotometria de qualidade e quantidade de DNA (FINKELDEY et al., 2010).

**Tabela 2-** Concentração e pureza de DNA genômico extraído a partir de folha e córtex.

Material	Amostra	DNA Genômico total (ng/ul)	A260/A280	A260/A230
Folha	1	81,9	1,94	1,82
	2	158,3	1,95	1,76
	3	164,2	1,96	1,77
	4	178,8	1,97	1,94
	5	215,1	1,99	1,87
	6	252,9	2,02	2,05
	7	310,7	1,97	2,03
Córtex	8	105,2	1,96	1,97
	9	177,4	1,94	2,00
	10	189,9	1,93	2,03
	11	219,2	1,91	2,00
	12	264,4	1,90	2,16
	13	318,4	1,97	1,97
	14	404,8	1,96	1,96



**Figura 2.** DNA genômico em 0,8% de gel de agarose, com corrida de aproximadamente 1:00 hora. (A) Amostras de DNA extraído de folha. (B) Amostras de DNA extraído de córtex.



**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) e poliacrilamida (6%) mostrando os perfis de PCR amplificado de seis *primers* (EE8; EE23; EE32; EE43; EE45; EE47) em *Euterpe edulis*. Marcador de 50 pb para géis de agarose, e de 100 pb para géis de poliacrilamida. As amostras de folhas estão enumeradas de um a sete e córtex de oito a 14.

## CONCLUSÕES

O protocolo de extração baseado no método CTAB (Brometo de cetil-trimetil amônio) (Doyle; Doyle, 1990) modificado pelo CENARGEN (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998) foi eficiente para extração de DNA a partir de córtex (localizado na estipe) de *Euterpe edulis*, estabelecendo para a espécie um novo material por meio do qual pode-se obter DNA genômico de igual qualidade, quantidade e integridade que o obtido de folhas.

O córtex é uma opção menos trabalhosa, rápida, reproduzível, simples e eficaz para o isolamento de DNA, sendo uma abordagem atrativa para investigação genômica em larga escala. Além disso, este método pode ser testado para outras espécies da família Arecaceae e também em outras espécies que apresentam caule sem crescimento secundário.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, I.; ISLAM, M.; ARSHAD, W.; MANNAM, A; AHMAD, W; MIRZA, B. High-quality plant DNA extraction for PCR: An easy approach. **Journal of Applied Genetics**, v. 50, p. 105-107, 2009.

ALMEIDA-SCABBIA, R. J. Fitossociologia de um trecho de Floresta Atlântica no Parque Estadual Intervales, SP. Rio Claro, SP.M.Sc. **Tese, Universidade Estadual Paulista**, Rio Claro, Brazil, 1996.

BRITO, E. S.; ARAÚJO, M. C. P.; ALVEZ, R. E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B. A.; NOVOTNY, J. A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9389–9394, 2007.

CINGILLI, H. AKÇIN, A. High quality DNA isolation method for chickpea genotypes. **Turkish Journal of Biology**, n. 29, p. 1–5, 2005.

COISSON, J. D.; TRAVAGLIA, F.; PIANA, G.; CAPASSO, M.; ARLORIO, M. *Euterpe oleracea* juice as a functional pigment for yogurt. **Food Research International**, v. 38, p. 893–897, 2005.

CONTE, R.; REIS, M. S.; MANTOVANI, A.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and mating system of *Euterpe edulis* Mart. populations: a comparative analysis using microsatellite and allozyme markers. **Journal of Heredity**, v. 5, p. 476–482, 2008.

CONTE, R.; REIS, M. S.; VENCOVSKY, R. Effects of management on the genetic structure of *Euterpe edulis* Mart. populations based on microsatellites. **Scientia Forestalis**, v. 81, n. 72, p. 81-88, 2006.

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

FADINI, R. F.; FLEURY, M.; DONATTI, C. I.; GALETTI, M. Effects of frugivore impoverishment and seed predators on the recruitment of a keystone palm. **Acta Oecologica**, v.35, p.188–196, 2009.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 3 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.

GAIOTTO, F. A.; BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for heart of palm – *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Arecaceae). **Molecular Ecology**, v. 1, n. 1, p. 86-88, 2001.

GAIOTTO, F. A.; GRATTAPAGLIA, D.; VENCOVSKY, R. Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). **Journal of**

**Heredity**, v. 5, p. 399–406, 2003.

GLASEL, J. A. Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm/280 nm absorbance ratios. **BioTechniques**, n. 18, p. 62–63, 1995.

INÁCIO, M. R. C.; LIMA, K. M. G.; LOPES, V. G.; PESSOA, J. D. C.; TEIXEIRA, G. H. A. Total anthocyanin content determination in intact açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and palmitero-juçara (*Euterpe edulis* Mart.) fruit using near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate calibration. **Food Chem**, v. 136, p. 1160–1164, 2013.

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

KARACA, M.; INCE, A. G.; ELMASULU, S. Y; ONUS, A. N; TURGUT, K. Coisolation of genomic and organelle DNAs from 15 genera and 31 species of plants. **Analytical Biochemistry**, v. 343, p. 353–355, 2005.

LIMA, L. S. H. Crescimento de mudas de *Euterpe edulis* Martius em resposta a diferentes doses de fósforo. **Ciência Florestal**, v. 18, n. 4, p. 461-470, 2008.

MANCHESTER, K. A. Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. **BioTechniques**, v. 20, p. 968–970, 1996.

OUBORG, J.; PERTOLDI, C.; LOESCHCKE, V, BIJLSMA, R. K.; HEDRICK, P. W. Conservation genetics in transition to conservation genomics. **Trends in Genetics**, v. 26, n.4, p.177-187, 2010.

PASAKINSKIENĖ, I.; PASAKINSKIENĖ, V. Floral meristems as a source of enhanced yield and quality of DNA in grasses. **Plant Cell Reports**, n. 18, p. 490–492, 1999.

REIS, A.; KAGEYAMA, P. Y. *Euterpe edulis* Martius – (palmitero): **biologia, conservação e manejo**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 202-224, 2000.

ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n.22, p. 9135-3141, 2007.

RUFINO, M. S. M.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; TABERNERO, M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; SAURA-CALIXTO, F. Acerola and cashew apple as sources of antioxidants and dietary fibre. **International Journal of Food Science & Technology**. v. 45, n. 11, p. 2227–2233, 2010.

SABLOK, G.; GAHLOT, P. GUPTA, A. K.; PAREEK, K. SHEKHAWAT, N. S. Extraction of PCR usable DNA from trees adapted to arid environment. **Plant OMICS: Journal of Plant Biology & Omics**, n. 2, p. 103–109, 2009.

SINGH, V.; KUMAR, V. An optimised method of DNA isolation from highly mucilage rich

okra (*Abelmoschus esculentus* L.) for PCR analysis. **Pelagia Res Library**, v. 3, p. 1809–181, 2010.

STEFFAN, R. J.; GOKSOYR, J. BEJ, A. K.; ATLAS, R. M. Recovery of DNA from soils and sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 54, v. 12, p. 2908–2915, 1988.

SZAJDEK, A.; BOROWSKA, E. J. Bioactive compounds and healthpromoting properties of berry fruits: a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 63, p. 147–156, 2008.