

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR**



**UESC**

**ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL  
EM MORFOTIPOS DE *Euterpe edulis***

**Gislaine Mendes Coelho**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Julho de 2010**

Gislaine Mendes Coelho

**ESTRUTURA GENÉTICA  
POPULACIONAL EM MORFOTIPOS DE  
*Euterpe edulis***

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Santa  
Cruz, como parte das atividades  
obrigatórias para obtenção do título  
de Mestre em Genética e Biologia  
molecular.

**Área de concentração:** Genética e  
Biologia Molecular

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Julho de 2010**

C672

Coelho, Gislaine Mendes.

Estrutura genética populacional em morfotipos de *Euterpe edulis* / Gislaine Mendes Coelho .– Ilhéus, BA: UESC, 2010.  
xi, 52f. : il.

Orientadora: Fernanda Amato Gaiotto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia molecular.

Referências: f. 40-52.

1. Genética de populações. 2. Palmito. 3. Genética vegetal.  
4. Palmeira – Cultivo. I. Título.

CDD 576.58

Gislaine Mendes Coelho

# **ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL EM MORFOTIPOS DE *Euterpe edulis***

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Santa  
Cruz, como parte das atividades  
obrigatórias para obtenção do  
título de Mestre em Genética e  
Biologia molecular.

APROVADA: 26 de julho de 2010

Prof. Dr<sup>a</sup>. Karina Martins  
(UFSCar)

Prof. Dr. Roberto Tarazi  
(UESC)

Prof. Dr. Ronan Xavier  
(UESC)

Prof. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Amato Gaiotto  
(UESC - Orientadora)

## DEDICATÓRIA

À minha família,  
pelo amor incondicional, incomparável e  
confiança na minha capacidade de vencer e atingir meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, que me fortaleceu quando me encontrava fraca, que me mostrou a cada momento de dificuldade que eu não poderia desistir.

Ao meu namorado, Carlindo, que mesmo à distância esteve sempre presente, me apoiando e mostrou-se ser mais do que um namorado, um companheiro e grande amigo.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pela contribuição à minha formação.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pela estrutura física para o desenvolvimento do meu trabalho.

À Coordenação de Apoio à Formação de Pessoal em Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

À FAPESB, pelo financiamento do projeto.

À minha orientadora, professora Dr<sup>a</sup>. Fernanda Amato Gaiotto, pessoa de imensa importância nos grandes ensinamentos que adquiri durante mestrado e pela confiança na minha capacidade de desenvolver esse projeto.

Às co-orientadoras Dr<sup>a</sup> Janisete Muller e Dr<sup>a</sup> Romari Martinez, pela colaboração e auxílio.

Às pessoas que me ajudaram nas coletas, Josiane Amorim, Mariana Barreto, Elaini Oliveira, Marcelo Bramucci, Rodolpho Mafei e Dário Ahnert.

Aos técnicos do laboratório de Biotecnologia (CEPEC-CEPLAC), Ramon e Reinaldo, pelo apoio nas obtenções dos dados genéticos.

Ao Dr. Roberto Tarazi e doutorando Ivandilson e Claudine pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos amigos e colegas do Programa Elaini, Mariana, Jeiza, Leonardo, Juliano, Marla e Tahise por sempre me apoiarem nos momentos difíceis e dividirem momentos de alegria.

Aos bolsistas de iniciação científica Cleydson e Rebeca, pela contribuição para realização deste trabalho.

## ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>EXTRATO .....</b>  | <b>ix</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>  | <b>xi</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>2.1. Gênero Euterpe .....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>2.1.1. A espécie.....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>2.2. Especiação.....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>2.3. Estrutura Genética Populacional .....</b>                             | <b>11</b> |
| <b>2.4. Microssatélites .....</b>   | <b>14</b> |
| <b>3. METODOLOGIA .....</b>   | <b>17</b> |
| <b>3.1. Áreas de Coleta .....</b>   | <b>17</b> |
| <b>3.2. Coleta do Material Vegetal e Extração de DNA.....</b>                 | <b>19</b> |
| <b>3.3. Quantificação do DNA.....</b>   | <b>19</b> |
| <b>3.4. Obtenção de Dados Genéticos .....</b>                                 | <b>20</b> |
| <b>3.5. Análises Estatísticas.....</b>  | <b>21</b> |
| <b>4. RESULTADOS.....</b>   | <b>23</b> |
| <b>4.1. Diversidade Genética e Índice de Fixação .....</b>                    | <b>23</b> |
| <b>4.2. Estrutura Genética .....</b>  | <b>25</b> |
| <b>4.3. Fluxo Gênico Aparente ou Histórico .....</b>                          | <b>26</b> |
| <b>4.4. Agrupamento populacional .....</b>                                    | <b>27</b> |
| <b>5. DISCUSSÃO .....</b>   | <b>32</b> |
| <b>5.1. Diversidade Genética e Índice de Fixação .....</b>                    | <b>32</b> |
| <b>5.2. Estrutura Genética, Fluxo Gênico e Agrupamento Populacional .....</b> | <b>34</b> |
| <b>6. CONCLUSÕES .....</b>  | <b>39</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                    | <b>40</b> |

## EXTRATO

Coelho, Gislaine Mendes, MS; Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, julho de 2010. **Estrutura Genética Populacional em morfotipos de *Euterpe edulis*.** Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Fernanda Amato Gaiotto. Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Janisete Gomes da Silva Miller. Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Romari Alejandra Martinez

A diversidade biológica emerge através da especiação com o surgimento de novas espécies a partir de um ancestral comum. Tal evento pode ocorrer, entre outros existentes, devido a divergências genéticas causadas pelo elevado nível de isolamento reprodutivo. Alguns fatores tais como separação geográfica, período de acasalamento distinto, atração a diferentes polinizadores e incompatibilidade física, com não-correspondência morfológica das flores impedindo a reprodução cessam o fluxo gênico entre populações a ponto de acarretar distinções fenotípicas e genéticas. Algumas populações da espécie *Euterpe edulis* Mart., também conhecido como palmito-juçara, situadas na Mata Atlântica do sul da Bahia são distintas fenotipicamente das populações encontradas em outras regiões do Brasil. Devido a possibilidades de tais distinções serem ocasionadas por divergências genéticas entre os morfotipos, objetivou-se estimar a estrutura genética em oito populações naturais de *Euterpe edulis* fenotipicamente distintas, sendo três de morfotipo verde e cinco de ecótipo Bahia, através de 14 locos microssatélites. As amostras foram obtidas em populações do Distrito Federal e do sul da Bahia. As estatísticas descritivas, estatísticas  $F$  e identidade genética entre indivíduos pelo método de agrupamento UPGMA foram obtidos no programa GDA. A estrutura genética entre populações foi feita a partir do parâmetro  $R_{ST}$  obtido pelo programa FSTAT e  $G'_{ST}$  calculado com base nas heterozigosidades esperadas das subpopulações. O número de migrantes ( $Nm$ ) foi calculado com base nos valores de  $F_{ST}$  de populações em pares. A inferência de número de grupos populacionais foi feita com base no

modelo bayesiano implementado no programa Structure e o  $\Delta K$  (número real de grupos). A estimativa da presença de alelos nulos nos locos microssatélites foi feita a partir do programa MICRO-CHECKER. Os resultados obtidos demonstraram uma diversidade genética menor e uma elevada frequência de alelos nulos nas populações do sul da Bahia, causados possivelmente pela transferência de microssatélites desenvolvidos para populações típicas de *E. edulis* para as populações de ecótipo Bahia. Os valores de  $F_{ST}$ ,  $R_{ST}$  e  $G'_{ST}$  mostraram elevada estrutura genética entre populações. A análise de estrutura genética em populações em pares e as taxas de  $Nm$  demonstraram que os elevados níveis de divergência genética interpopulacional se devem provavelmente ao isolamento reprodutivo entre populações com distinções fenotípicas. Populações próximas geograficamente, porém de diferentes morfotipos, apresentaram níveis de diferenciação genética maiores que populações isoladas devido a elevadas distâncias geográficas. O agrupamento realizado tanto pelo método UPGMA como pelo método bayesiano agruparam as populações em relação aos morfotipos e não às áreas de coleta, corroborando uma possível hipótese de isolamento reprodutivo. O presente estudo demonstrou que a partir de estimativas de parâmetros de genética de populações foi possível inferir um possível isolamento reprodutivo de ocorrência provavelmente natural, o que poderá vir a formar uma nova espécie do gênero no futuro. Com base nos dados ora apresentados é possível a recomendação de especial atenção e esforços de conservação para as populações desta espécie ocorrentes no sul da Bahia, já que são raras e únicas do ponto de vista fenotípico e de endemismo restrito.

Palavras-chave: estrutura genética populacional, isolamento reprodutivo, morfotipos, palmito-juçara, fluxo gênico.

## ABSTRACT

Coelho, Gislaine Mendes, MS; Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, julho de 2010. **Population Genetic Structure of *Euterpe edulis* morphotypes.** Advisor: Dr<sup>a</sup>. Fernanda Amato Gaiotto. Co-Advisor: Dr<sup>a</sup>. Janisete Gomes da Silva Miller. Co-Advisor: Dr<sup>a</sup>. Romari Alenjadra Martinez

The emergence of new species expands the biological diversity. Speciation may occur due to genetic differences caused by reproductive isolation, among other factors. Some factors such as geographical separation, distinct breeding season, occurrence of different pollinators and morphological aspects of flowers that prevent fecundation, reduce gene flow among populations resulting in genetic and phenotypic differences. Some populations of *Euterpe edulis* Mart., also known as heart-of-palm, located in the Atlantic Forest of southern Bahia are phenotypically distinct when compared with other populations found in different regions of Brazil. From the hypothesis of such morphological differences reflect strong genetic differentiation among populations, this study aimed to estimate the genetic structure of eight natural populations of *Euterpe edulis* phenotypically distinct. This study was conducted in three populations of the green morphotype and five populations of Bahia ecotype, using 14 microsatellite loci. Individuals were sampled in populations from Distrito Federal and south of Bahia. The descriptive genetic statistics,  $F$  statistics, and genetic identity between individuals by the UPGMA clustering method were obtained using the GDA software. The population genetic structure was estimated from the  $R_{ST}$  parameter by FSTAT software and  $G'_{ST}$  was calculated based on the expected heterozygosities of the populations. The number of migrates ( $Nm$ ) was estimated for each pair of populations based on the  $F_{ST}$  values. The inference of the number of population groups was based on Bayesian model implemented by the program STRUCTURE and  $\Delta K$  (real number of groups) was also determined. The presence of null alleles in microsatellite loci was done by MICRO-CHECKER software. The

results showed a low observed heterozygosity and a high frequency of null alleles in southern Bahia populations, possibly caused by the transfer of microsatellites, developed for typical populations of *E. edulis*, to the population of Bahia ecotype. Values of  $F_{ST}$ ,  $R_{ST}$  and  $G'_{ST}$  showed high genetic divergence among populations. The analysis of population genetic structure and  $Nm$  in pairs of populations indicated that high levels of interpopulation genetic divergence are probably due to reproductive isolation between populations with different morphotypes. Populations geographically near, but of different morphotypes showed higher levels of genetic structure than populations with large geographical distances. Such UPGMA as Bayesian methods grouped the populations according to the morphotypes and did not to the geographical locations. Our results also corroborated the hypothesis of reproductive isolation. The estimation of population genetics parameters helped to infer the possibility of natural reproductive isolation. This behavior of the population can probably generate the emergence of a new species in the future. Based on the data verified herein it is mandatory the recommendation of special attention of conservation efforts for the southern Bahia populations of this species, as they are phenotypically unique, rare, and occur in a geographically restricted endemic area.

Key Words: population genetic structure, reproductive isolation, morphotype, heart-of-palm, gene flow.

## 1. INTRODUÇÃO

O palmito-juçara (*Euterpe edulis* Mart.) e o palmito-vermelho (*Euterpe espirosantensis* Fernandes) são palmeiras nativas da Mata Atlântica do Brasil. O primeiro é encontrado desde o Rio Grande do Sul até a Bahia, inclusive na composição florística de matas ciliares e de matas secundárias (BORÉM; OLIVEIRA-FILHO, 2002; MEIRA NETO et al., 2003). O segundo ocorre em florestas naturais na região de Santa Teresa, no Estado do Espírito Santo (FERNANDES, 1989). Devido à importância econômica do seu principal produto, o palmito, estas espécies foram amplamente exploradas na Mata Atlântica de maneira geral. A extração do palmito durante a fase reprodutiva da palmeira, juntamente com sua incapacidade de perfilhamento, ou seja, ausência de rebrotamento após a extração do palmito são os principais fatores que afetam a dinâmica dessas espécies.

A impossibilidade da manutenção da dinâmica populacional devido à exploração exacerbada do palmito e o crescimento da expansão agrícola acarretaram a extinção de populações de *E. edulis* em vastas áreas do domínio da Mata Atlântica (BATISTA et al., 2000).

Em algumas regiões da Mata Atlântica do sul da Bahia há populações fenotipicamente distintas de palmito-juçara, as quais foram designadas por BOVI et al. (1987b) como ecótipo da Bahia. Essas populações possuem características diferentes de *Euterpe edulis* e de *Euterpe espirosantensis*, sendo que a principal diferença refere-se à coloração da bainha das folhas. Outros atributos distintos foram observados no ecótipo encontrado na Bahia (SILVA et al., 2009), tais como números de ráquias, flores e frutos inferiores aos observados em populações típicas *Euterpe edulis* de outras regiões da Mata Atlântica.

SILVA et al. (2009) citam que tais características podem estar relacionadas a diferenças genéticas entre os ecótipos encontrados na Mata Atlântica. Com tal

suposição e devido às particularidades observadas no ecótipo da Bahia, o conhecimento da diversidade genética poderia auxiliar na identificação das razões que estariam acarretando divergências fenotípicas nas populações de palmito-juçara.

Com os avanços tecnológicos e a necessidade de uma maior compreensão dos efeitos das ações antrópicas sobre a dinâmica das populações naturais de espécies arbóreas, estudos genéticos têm sido intensivamente realizados. Tais estudos avaliam grandes amostras de populações, indivíduos e locos, o que permite quantificar adequadamente a diversidade genética inter e intrapopulacional existente.

Esses dados têm sido úteis, por direcionar o desenvolvimento de planos de conservação a fim de minimizar os impactos ambientais nesses ecossistemas e preservar características próprias das espécies e populações, como no caso das populações de *Euterpe edulis* do sul da Bahia. Estudos genético-ecológicos em espécies representativas, tanto em florestas não perturbadas como em matas secundárias, vêm mostrando o efeito das ações antrópicas em suas populações, auxiliando na definição dos parâmetros genéticos mais adequados para orientar e monitorar as ações nesses ecossistemas (KAGEYAMA et al., 1998).

A obtenção dos parâmetros genéticos pode ser feita com a utilização de marcadores moleculares que detectam polimorfismo genético diretamente do DNA. Dentre os diversos marcadores, os do tipo microssatélites são amplamente utilizados. Esses marcadores, também conhecidos como Sequências Simples Repetidas (SSR) (LITT; LUTY, 1989), têm sido usados em estudos de genética de populações naturais de espécies tropicais (COLLEVATTI et al., 2001; MELO et al., 2007; SEBBENN et al., 2010), inclusive de *Euterpe edulis* (GAIOTTO et al., 2003; CONTE et al., 2008). Isto ocorre porque tais marcadores possuem alto poder de discriminação, o que é essencial nestes estudos. Algumas de suas importantes características podem ser citadas: i) são altamente polimórficos; ii) multialélicos; iii) codominantes; iv) abundantes e uniformemente distribuídos por todo o genoma e v) facilmente obtidos através de ensaios de PCR.

O presente estudo teve como principal objetivo estimar a estrutura genética em oito populações naturais de *Euterpe edulis* fenotipicamente distintas, através de ferramentas moleculares, a fim de gerar subsídios genéticos para a conservação dos

morfotipos que ocorrem na região sul baiana. Visando atingir esse principal objetivo foram propostos os seguintes objetivos específicos: i) Descrever, do ponto de vista genético, tais populações utilizando 14 locos de marcadores microssatélites nucleares; ii) Estimar a estrutura genética; iii) relacionar distância física com fluxo gênico aparente ( $Nm$ ), iv) inferir agrupamentos populacionais com base em dados moleculares e relacioná-los à dados fenotípicos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Gênero *Euterpe*

A Mata Atlântica abriga nove gêneros e 39 espécies de palmeiras, dos quais um gênero e 32 espécies são endêmicas (GLASMAN, 1972). O Brasil é o maior produtor e exportador de palmito do gênero *Euterpe* pertencente à família Arecaceae. Este gênero possui sete espécies distribuídas nos trópicos (HENDERSON et al., 1995), das quais quatro são encontradas no Brasil.

Muitas das palmeiras fornecem palmito comestível, porém há vinte anos apenas duas espécies eram responsáveis pela quase totalidade do mercado, sendo estas denominadas *Euterpe edulis* Mart. e *Euterpe oleracea* Mart., as quais foram superexploradas comercialmente para a produção industrial (BOVI et al., 1987a). A primeira é comumente conhecida como Juçara ou Içara, é uma palmeira tropical da floresta Ombrófila Densa da Mata Atlântica, encontrada desde o Rio Grande do Sul (latitude 30°S) até a Bahia (latitude de 15°S) (SEOANE et al., 2005), e também no leste do Paraguai e nordeste da Argentina (REIS, 1995). A segunda espécie, conhecida como Açaí ou Açaizeiro, é uma palmeira nativa da região norte do Brasil, ocorrendo nos Estados do Pará, Amazonas, Maranhão e Amapá, estendendo-se às Guianas e Venezuela (CALZAVARA, 1972).

A espécie *E. oleracea* Mart. fornece um produto de menor rendimento e de qualidades organolépticas não tão delicadas, porém possui a grande vantagem de perfilhamento, o que determina uma produção quase que contínua de palmito (BOVI et al., 1978). A extração do palmito é feita de sete a oito anos após a germinação. Devido ao ciclo longo, seu retorno financeiro é demorado, sendo um dos principais fatores que desestimulam seu cultivo com objetivo de produção direcionada para extração do palmito.

Há, ainda, uma espécie pouco estudada que sofre uma grande devastação do seu habitat devido à extração do palmito, o *Euterpe espirosantensis* Fernandes, conhecido como Palmito-Vermelho, é encontrado em florestas naturais na região de Santa Teresa, no estado do Espírito Santo (FERNANDES, 1989). Possui propagação natural exclusivamente através sementes e incapacidade de perfilhamento, sendo impossível sua regeneração após o abate (BOVI, 1984).

A quarta espécie é o *Euterpe precatória*, vulgarmente conhecida como açai-do-amazonas e açai-solteiro. Tem distribuição por toda a região Amazônica (KAHN; GRANVILLE, 1992), sendo uma das espécies mais difundidas e comuns da família e do gênero nos Neotrópicos (HENDERSON, 1995). O mesocarpo comestível é a parte mais utilizada do fruto, de onde é extraído, a partir de frutos frescos, um líquido espesso conhecido como “vinho de açai”. Possui incapacidade de perfilhamento, apresentando um único estipe.

### **2.1.1. A espécie**

A mais bem estudada espécie desse gênero e a de interesse nesse estudo é o *Euterpe edulis* Mart. Seu principal produto é o palmito, composto do meristema apical e das folhas novas indiferenciadas recobertas por uma bainha de coloração geralmente esverdeada. Fornece matéria-prima de bom diâmetro, boas qualidades organolépticas e grande rendimento, porém não apresenta regeneração após o abate, por possuir incapacidade de perfilhamento (LEÃO; CARDOSO, 1974).

Na fase adulta pode atingir de 10 a 20 metros de altura, com estipe de 8 a 15 centímetros de diâmetro, apresentando no ápice um agrupamento de 10 a 20 folhas pinadas (REIS et al., 1996). É considerada uma espécie climáxica, necessitando de sombra para seu desenvolvimento inicial (REITZ et al., 1978).

É uma espécie monóica, com flores unissexuadas reunidas em tríades, sendo observadas duas flores masculinas e uma feminina em um único indivíduo. Tem início da vida reprodutiva em torno dos 30 anos, com floração anual e sazonal, iniciando-se entre o sexto e oitavo ano após a germinação, e produz, em média, três inflorescências por ano, rendendo em torno de 3000 sementes (BOVI; DIAS, 1986a). Possui protandria acentuada com abertura das flores femininas ocorrendo em torno

de sete dias depois do final da floração masculina (MANTOVANI; MORELLATO, 2000), assegurando assim, xenogamia nessa espécie.

Estudos sobre o sistema de reprodução de *E. edulis* indicaram que a espécie é favoravelmente de reprodução cruzada (REIS et al., 1993; GAIOTTO et al., 2003), demonstrando cruzamentos não aleatórios com peculiaridades no processo reprodutivo associados, provavelmente, ao amplo período de florescimento (SEOANE et al., 2005). A autofecundação pode ocorrer em indivíduos que emitem duas ou mais inflorescências na mesma árvore, ou se houver sobreposição da fase masculina e feminina entre as inflorescências. Tal evento ocorre em 6,4% das plantas reprodutivas (REIS et al., 1993), quando as flores masculinas e femininas estão abertas ao mesmo tempo.

As flores masculinas oferecem como recurso floral néctar e grande quantidade de pólen e de elementos florais, e as flores femininas oferecem néctar. Devido a isso, grande quantidade e variedade de insetos são atraídos a visitar as inflorescências de *E. edulis*, tais como moscas (Diptera), vespas, abelhas (Hymenoptera), besouros (Coleoptera) e borboletas (Lepidoptera) (REIS et al., 1993; MANTOVANI, 1998). Como principal inseto polinizador, REIS et al. (1993) destacam a espécie *Trigona spinipes*. MANTOVANI (1998) cita que a polinização por insetos (entomofilia) provavelmente seja o modo predominante, não excluindo a importância da polinização pelo vento (anemofilia), pois esta desempenha algum papel na polinização da espécie.

Por ser elevada a produção de frutos, com o amadurecimento destes em uma época de escassez geral de alimentos, *E. edulis* é considerada uma espécie guarda-chuva por muitos autores (REIS, 1995; GALETTI; ALEIXO, 1998; REIS; KAGEYAMA, 2000; GAIOTTO et al., 2003) pois seus frutos servem de alimento para grandes pássaros e mamíferos durante um período de aproximadamente seis meses ao ano (MANTOVANI; MORELLATO, 2000). Consequentemente, essa fauna atua como dispersores de sementes, contribuindo para a manutenção da dinâmica demográfica e do fluxo gênico (REIS; KAGEYAMA, 2000).

Em análises de populações naturais de *E. edulis*, observou-se uma estrutura demográfica em forma de pirâmide, com a base representando a grande frequência de plantas juvenis e no topo o pequeno número de indivíduos reprodutivos (REIS, 1995). Estes dados sugerem forte dependência de populações a um número

pequeno de indivíduos reprodutivos, os quais são responsáveis pela manutenção da diversidade genética, estrutura genética e estrutura demográfica de toda a população.

Além da drástica redução de populações devido à ação extrativista e ao corte discriminado do palmiteiro, espécies desse gênero possuem baixo índice de sobrevivência devido à competição por água, nutrientes e luminosidade, por haver grande produção de frutos e conseqüentemente mudas, próximas uma das outras, em condições favoráveis (BOVI et al., 1987b).

Nas últimas décadas, vêm-se intensificando os estudos genéticos em populações de espécies arbóreas de florestas tropicais, com amostragens adequadas tanto de populações como de indivíduos, além do uso de tecnologias genéticas adequadas para quantificar essa diversidade, como os realizados por REIS et al., (1998), GAIOTTO et al., (2003) e CONTE et al., (2008), os quais analisaram sistema reprodutivo, fluxo gênico, variabilidade e estrutura genética em diferentes estruturas populacionais do palmiteiro, utilizando marcadores isoenzimáticos e microssatélites.

Em algumas regiões da Mata Atlântica do sul da Bahia há diferentes morfotipos de *Euterpe edulis* (BOVI et al., 1987b)(FIGURA 1). Algumas populações possuem características distintas de *Euterpe edulis* e de *E. espiritosantensis*. Nestas populações a coloração da bainha das folhas é intermediária entre o verde característico de *E. edulis* e o vermelho de *E. espiritosantensis*, apresentando coloração amarelada ou alaranjada. Além disso, possuem características reprodutivas diferentes de outras populações de *E. edulis* que foram estudadas em outras regiões do país. Chegam a produzir três vezes menos frutos do que uma população típica de *E. edulis* produziria (BOVI et al., 1987b).



**FIGURA 1.** Distinções fenotípicas entre populações de palmito-juçara situada no sul da Bahia. Destaque para coloração da bainha das palmeiras. Palmeiras amostradas em A: Faz. Alto da Esperança (Itacaré-BA); B: Rebio-Una (Una-BA); C: Faz. Boa Sorte (Uruçuca-BA); D: Parque Nacional de Brasília (Brasília-DF). Fotografias A, B, C: Gislaïne Coelho; D: Fernanda Gaiotto.

## 2.2. Especiação

A diversidade emerge através do surgimento de novas espécies a partir de um ancestral comum, por meio do mecanismo denominado especiação (FUTUYMA, 2002). Esse mecanismo depende do aparecimento e manutenção do isolamento reprodutivo entre as espécies (COYNE; ORR, 2004).

A visão biológica do conceito de espécie refere-se a grupos de populações onde seus membros se inter cruzam e estão isolados reprodutivamente de outros grupos (MAYR, 1963) e essa concepção é um ponto crucial para o estudo da especiação. O isolamento reprodutivo entre indivíduos é produto da ação de barreiras de isolamento, podendo ser: (i) separação geográfica; (ii) período de acasalamento distintos; (iii) seleção sexual, no caso de espécies animais, onde a atração mútua entre as espécies distintas seja fraca ou ausente e no caso de espécies vegetais, a atração de diferentes polinizadores; (iv) incompatibilidade física, a não-correspondência morfológica das genitálias ou parte das flores impede a cópula ou polinização (DOBZHANSKY, 1970). Estas situações podem acarretar tanto ao isolamento pré-zigótico, quanto isolamento pós-zigótico.

No caso de plantas, as barreiras pré-zigóticas estão relacionadas à especificidade do polinizador, germinação do pólen no estigma, crescimento do tubo polínico no pistilo e períodos de florescimento (HENDRY; DAY, 2005).

O isolamento pré-zigótico evolui como subproduto da divergência entre populações que se adaptaram a condições diferentes, impedindo assim, o intercruzamento entre elas, seja devido à polinização por diferentes polinizadores,

seja na diferença de épocas de acasalamento. Esse tipo de isolamento evoluiu devido à divergência de locos responsáveis por características relacionadas com isolamento pré-zigótico (BRADSHAW; SCHEMSKE, 2003).

As distinções genéticas entre indivíduos de uma população também podem ser oriundas de diferentes períodos reprodutivos dentro de uma temporada. Dentro de tais populações, características fenotípicas frequentemente covariam com período reprodutivo, como no caso de número de flores em florescências de plantas (ANDERSSON, 1996).

No isolamento pós-zigótico há ocorrência de fecundação, porém a prole originada é híbrida, mas ou ela tem baixa aptidão e morre antes de cruzar, ou sobrevive, porém é estéril (RIDLEY, 2006). Em espécies de plantas, a ocorrência de isolamento pós-zigótico acarreta em esterilidade de pólen e ausência do desenvolvimento de semente, mesmo ocorrendo fecundação.

Quando há sobrevivência de híbridos férteis, estes podem retrocruzar com uma das espécies parentais, através da Introgressão (HEGARTY; HISCOCK, 2005). A introgressão ocorre por muitas gerações, até que a população híbrida torna-se reprodutivamente isolada da espécie parental, por ter evoluído para uma nova espécie, a qual possuirá uma mistura complexa de genes parentais (RIDLEY, 2006).

Estudos sobre os diferentes componentes de isolamento reprodutivo em plantas (CHARI; WILSON, 2001; RAMSEY et al., 2003; KAY, 2006) mostraram que o isolamento pré-zigótico foi mais atuante na redução do fluxo gênico entre pares de espécies que o isolamento pós-zigótico. RAMSEY et al. (2003) argumentam que não somente o isolamento reprodutivo pré-zigótico impede o fluxo gênico entre as espécies, mas um conjunto de fatores relacionados ao isolamento.

O poder do isolamento pós-zigótico em cessar o fluxo gênico entre espécies está relacionado com a distância genética entre essas espécies. Estudos recentes mostraram que a força do isolamento pós-zigótico aumenta com o aumento da distância genética entre os taxos e que essa correlação pode influenciar na evolução das barreiras pós-zigóticas (MOYLE et al., 2004; SCOPECE et al., 2008).

De acordo a teoria da especiação geográfica, diferenças genéticas acumulam em populações isoladas. Essas diferenças são geradas por seleção e deriva genética e, geralmente levam ao isolamento reprodutivo de espécies em desenvolvimento. O isolamento geográfico é quase que invariavelmente necessário

para que ocorra a especiação, e nesse caso ocorre *especiação alopátrica*, como causa da evolução de uma nova espécie isolada geograficamente de sua espécie ancestral (MAYR, 1970).

A evolução independente de duas populações isoladas, leva à fixação de alelos diferentes em cada uma delas, seja por deriva ou por adaptação ao meio ambiente. Provavelmente os caracteres relacionados à adaptação ecológica estejam correlacionados geneticamente com os caracteres que influem no isolamento pré-zigótico, por existir pleiotropia entre os genes (RIDLEY, 2006).

Populações que se diferenciaram em alopatria, porém não são denominadas de espécies distintas, inter cruzam-se em maior ou menor extensão por um contato secundário em Zonas Híbridas. São nessas regiões que ocorre o fenômeno de hibridação introgressiva, onde cada um dos vários locos exibem uma clina na frequência alélica, que variam dimensionalmente entre os locos (FUTUYMA, 2002).

A evolução de novas espécies em populações que não estão completamente separadas e são contíguas é dito ser um processo de especiação parapátrica. ENDLER (1977) argumenta que várias das zonas híbridas que geralmente são atribuídas a contato secundário, podem realmente ter se originado *in situ* pela diferenciação das populações que se relacionam parapatricamente e que espécies podem originar-se de populações parapátricas.

A grande idéia contrária à especiação parapátrica é que a ação da seleção sobre os locos deve ser distinta em cada um, levando à origem de clinas em diferentes locais, ao invés do mesmo local, como ocorre em zonas híbridas (FUTUYMA, 2002). Se a adaptabilidade dos genótipos para um loco é epistático a outro que está sujeito à seleção clinal, a variação em um loco será paralela devido à variação geográfica do outro loco (SLATKIN, 1975).

A especiação pode ser simpátrica caso ocorra o surgimento de uma barreira biológica ao intercruzamento, dentro dos limites de uma população panmítica, sem nenhuma segregação geográfica das espécies principiadas (FUTUYMA, 2002). O provável surgimento de espécies a partir da simpatria provém de poliploidia, que normalmente ocorre em plantas. Caso ocorra tetraploidia em híbridos oriundos de duas espécies diplóides, este será reprodutivamente isolado, pois a progênie triploide resultante do retrocruzamento terá altas proporções de gametas aneuplóides e inviáveis (ELLSTRAND et al., 1996).

SAVOLAINEM et al. (2006) avaliaram a especiação em populações de palmeiras do gênero *Howea* que habitam Ilhas Oceânicas e se relacionam simpatricamente. Análises com base na época de florescimento e divergência gênica ( $F_{ST}$ ) a partir de dados de locos AFLP constataram que os picos de florescimento entre as espécies ocorrem em períodos distintos e resultados de frequência alélica mostraram que loci que divergiram em frequência, provavelmente poderão estar ligados a genes sujeitos a seleção divergente durante a especiação simpátrica.

Ainda é um grande desafio a identificação das diferentes barreiras de isolamento e sua contribuição para o isolamento reprodutivo, juntamente com a compreensão de como as interações ecológicas e moleculares entre os diferentes componentes de isolamento reprodutivo atuam na redução do fluxo gênico entre as populações e espécies (WIDMER et al., 2008).

A determinação da velocidade com que surgem os diferentes obstáculos no isolamento reprodutivo em espécies de plantas, além da importância de cada barreira de isolamento no impedimento de fluxo gênico entre as espécies foram estudadas recentemente (RAMSEY et al., 2003; KAY, 2006; YANG et al., 2007). Porém a dificuldade em quantificar a importância relativa de cada barreira de isolamento permanece.

### **2.3. Estrutura Genética Populacional**

A estrutura genética populacional é descrita como a distribuição da variação genética entre populações devido a forças evolutivas que agiram nas populações de determinada espécie ao longo do tempo (HEDRICK, 2001).

O estudo da estrutura genética de uma população era, antigamente, realizado através de caracteres morfológicos dos indivíduos. Estas características fenotípicas, que eram influenciadas pelo ambiente, não apresentavam número de marcadores morfológicos polimórficos suficientes para uma análise genética aprofundada. Com os avanços da genética molecular, as análises são independentes de diferenças visíveis pois são obtidas a partir de marcadores moleculares, os quais fornecem inúmeros dados genéticos abrangendo todo o genoma (HARTL; CLARK, 1997).

O detalhamento da estrutura genética populacional, ou seja, a detecção de diferenças genéticas entre organismos é feita com a quantificação dos níveis de

variabilidade dentro das populações e a caracterização do modo de distribuição dessa variabilidade. FUTUYMA (2002) refere – se à diversidade genética como o nível de variabilidade gênica existente dentro de cada população, a qual pode ser medida pelo nível de heterozigosidade esperada nas proporções do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

A base do teorema de Hardy-Weinberg presume que uma população, para que esteja em equilíbrio, deve possuir: (i) tamanho infinito; (ii) o cruzamento entre os indivíduos deve ser aleatório (panmítica); (iii) não ocorrer introdução de novos alelos a partir de qualquer fonte externa ou interna e (iv) ter alelos igualmente competentes na síntese de suas próprias cópias, as quais incorporam – se ao conjunto gênico de gametas (FUTUYMA, 2002).

As populações naturais que não estão sofrendo fragmentação, encontram - se em equilíbrio, pois todas as forças evolutivas estariam atuando mutuamente sobre a diversidade genética (FUTUYMA, 2002). A deriva e a seleção estariam atuando na redução de diversidade nas populações enquanto a mutação e migração estariam aumentando a variabilidade genética. Essas forças agem como vetores onde um anula a ação do outro sobre a variação genética que, por conseguinte, não sofre alterações nas frequências gênicas e genotípicas no decorrer das gerações.

Porém, quando há uma fragmentação natural ou antrópica, esta irá acarretar em um declínio nos tamanhos populacionais e a separação de fragmentos florestais por áreas não florestadas afetando os processos genéticos ocorrentes nas populações, como o fluxo gênico e a reprodução ocasionando a perda de alelos por deriva genética. Consequentemente acelerando a perda de diversidade genética tanto no nível populacional quanto de espécie, aumentando a estrutura interpopulacional e a endogamia (HEDRICK, 2001).

WRIGHT (1951) para descrever a distribuição da variação genética em populações desenvolveu as Estatísticas  $F$ . Esses parâmetros são utilizados para medir a diferenciação genética entre populações ( $F_{ST}$ ) (HARLT; CLARK, 1997). Essa medida é feita com base no desvio em relação ao esperado em EHW em três níveis hierárquicos nas populações.

A análise da variação genética entre indivíduos pertencentes à mesma subpopulação é obtida a partir do  $F_{IS}$ . Esse parâmetro mede a perda de heterozigosidade devido à endogamia relacionada ao sistema reprodutivo, enquanto

que o parâmetro  $F_{ST}$  mede a redução proporcional na heterozigosidade da metapopulação por causa da diferenciação entre subpopulações relativo ao esperado caso não houvesse subdivisão populacional.

A redução de heterozigosidade na metapopulação total devido tanto ao cruzamento não aleatório dentro das subpopulações como pela deriva entre subpopulações é medido através do parâmetro  $F_{IT}$ .

Se todas as subpopulações apresentam exatamente as mesmas freqüências alélicas, então o  $F_{ST}$  e a variância serão iguais a 'zero'. Se a diferenciação aumenta, a variância e  $F_{ST}$  aumentarão. Devido a isso, o  $F_{ST}$  é encontrado em um intervalo de 0 a 1.

Fatores com a ocorrência de sistema de acasalamento não-aleatório, seja por possuir um sistema reprodutivo que favoreça a autofecundação, seja por razões de capacidade de dispersão limitada, facilitam o cruzamento entre indivíduos com maior probabilidade de terem algum grau de parentesco (FUTUYMA, 2002), ou seja, herdaram genes idênticos por descendência. Como consequência, tenderá à fixação de alelos, pois apenas uma amostra da população estará trocando genes ao acaso.

A perda de heterozigotos na população, devido à subdivisão populacional, acelerará o aumento da homozigosidade, efeito Wahlund, acarretando uma divergência alélica entre as populações e conseqüentemente a estruturação genética das mesmas. WEIR (1996) considera que a heterozigosidade esperada, ou diversidade gênica, é uma medida adequada para quantificar a variação tanto em população de espécies que se autofecundam como de cruzamentos.

A subdivisão de uma população origina uma diferença na conectividade entre as partes da mesma. Essa conexão genética depende primariamente da quantidade de fluxo gênico efetivo, ou seja, movimento entre os grupos, a partir da polinização entre flores de árvores distintas, que resulta em troca de genes. Esse fluxo atua como uma força homogeneizante que previne a divergência genética existente entre as populações conseqüente de deriva ou seleção (FELSENSTEIN, 1976), afetando todos os locos igualmente. WRIGHT (1951) argumenta que a movimentação de pelo menos um migrante por geração ( $Nm > 1$ ) é capaz de contrapor os efeitos da deriva.

Evidências da importância do fluxo gênico atuando na distribuição da variação genética entre as populações naturais são freqüentemente inferidas com base no potencial de dispersão de sementes, translocação de polinizadores ou migração de

indivíduos, no caso de espécies de animais. Espécies com elevada capacidade de dispersão exibem, freqüentemente, baixos níveis de diferenciação populacional (WAPLES, 1987).

O principal modelo conceitual para subdivisão ocorre em grandes populações é aquele de isolamento por distância, que WRIGHT desenvolveu (1943). Segundo o qual, quanto maior a distância entre as populações ou subpopulações, mais restrito é a intersecção entre as mesmas, seja por dispersão de pólen ou sementes, levando ao isolamento das unidades amostrais e ao aumento da divergência genética.

Compreender os padrões e extensão de divergência genética entre populações é crucial para proteção de espécies e desenvolvimento de planos efetivos de conservação. O conhecimento da estrutura genética de populações é essencial para identificar unidades a serem conservadas.

#### **2.4. Microssatélites**

Microssatélites, Repetições de Seqüências Simples (SSR) ou Curtas Repetições *in Tandem* (STR) são regiões do DNA repetitivas compostas de pequenos *motifs* de 1 a 6 nucleotídeos repetidos *in tandem*, amplamente distribuído por todo o genoma de eucariotos e procariotos (TAUTZ; RENZ, 1984).

Os microssatélites podem ser formados por unidades ou motivos de mono, di, tri, tetra, penta ou hexanucleotídeos (POWELL et al., 1996). Os dinucleotídeos formados por (CA)<sub>n</sub> e (GT)<sub>n</sub> são mais abundantes no genoma de organismos eucarióticos, principalmente em mamíferos e humanos (TAUTZ; RENZ, 1984). Porém, em genoma de plantas observa-se uma maior freqüência de microssatélites dinucleotídeos com repetições de (AT)<sub>n</sub> e (AG)<sub>n</sub> (WANG et al., 1994).

O conteúdo total de microssatélite no genoma é correlacionado ao tamanho do genoma dos organismos (HANCOCK, 1996). Estão em maior freqüência no genoma de mamíferos e humanos, e em menor quantidade no genoma de plantas e insetos. Em mamíferos, freqüentemente ocorrem a cada 6 Kb de DNA, enquanto que em plantas são encontrados a cada 33 Kb (WANG et al., 1994).

Os SSRs podem estar situados em regiões codificantes e não-codificantes. A baixa freqüência em regiões codificantes no genoma da maioria dos seres vivos é limitada pelo fato de que essas regiões estão sob pressão seletiva (METZGAR et al.,

2000). Porém, MORGANTE et al. (2002) ao compararem frequência de microssatélites entre região genômica e ESTs (etiqueta de sequência expressa ou “expressed sequence tag”) de plantas, observaram uma maior frequência em regiões UTRs (regiões não traduzidas ou “untranslated region”) dos ESTs. Os autores argumentam a possibilidade dos microssatélites estarem envolvidos na regulação da expressão gênica.

Eles são caracterizados por sua grande abundância (CONDIT; HUBBELL, 1991; RÖDER et al., 1995), alta variabilidade e grande distribuição por todo genoma (LIU et al., 1996; TARAMINO; TINGEY, 1996; RÖDER et al., 1998), comportamento codominante, podendo-se distinguir os indivíduos heterozigóticos dos homozigóticos dominantes em uma população (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). São marcadores neutros, ou seja, não sofrem pressões seletivas. Microssatélites são tipicamente locos multialélicos, sendo observados cinco alelos ou mais por locos, tanto em plantas como em animais.

O nível de polimorfismo dos microssatélites é dado pela variação que ocorre na sua unidade repetitiva. A hipervariabilidade das sequências e dinâmica evolutiva dos microssatélites estão relacionadas ao comprimento do motivo, o número de repetições, a presença de um ou mais motivos, sequência flanqueadora e a região em que o microssatélite está localizado (EISEN, 1999).

A sua instabilidade deve – se às altas taxas mutacionais, em que inserções e deleções levam à mudança no comprimento das sequências (TAUTZ; SCHLÖTTERER, 1994). Apresentam taxas de mutação de  $10^{-6}$  a  $10^{-2}$  por geração e são assim significativamente superiores às taxas de substituição de base. Devido a essa elevada mutabilidade, os microssatélites podem ter um significativo papel na evolução do genoma por aumentar e manter a variação genética. Quando localizado em regiões promotoras, os SSRs podem influenciar a atividade transcricional (KASHI et al., 1997).

A recombinação não é o mecanismo predominante de geração de variabilidade de microssatélites. O mecanismo de mutação proposto tem sido chamado de “deslizamento do DNA” (*Slippage*). Supõe-se que durante a replicação o DNA nascente e fita molde realinham fora da região. Se a síntese da molécula de DNA continua, o número de repetição dos microssatélites é alterado. A discrepância entre a elevada taxa mutacional de microssatélites com base em experimentos *in*

*vitro* e os observados em taxa de mutação *in vivo* (de  $10^{-6}$  a  $10^{-2}$ ) pode ser explicada pela presença de um erro no sistema de reparo. Foi demonstrado que um sistema de reparo reduz a taxa de mutação de microssatélites entre 100 e 1000 vezes (STRAND et al., 1993). Assim, as taxas mutacionais *in vivo* são resultados de dois processos: taxa de *Slippage* e eficiência do sistema de reparo.

A distribuição quase aleatória de microssatélites e seu elevado nível de polimorfismo facilitaram muito a construção de mapas genéticos e acesso a variabilidade genética em populações naturais ou de cativeiros (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Simultaneamente, os microssatélites foram estabelecidos como o marcador de escolha para a identificação de indivíduos e de testes de paternidade. A alta sensibilidade da análise de microssatélites baseados em PCR não foi apenas de grande benefício para a ciência forense, mas abriu completamente novas áreas de pesquisa, como a análise de amostras de DNA com quantidade limitada ou degradada (fezes, material de museu).

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Áreas de Coleta

A escolha dos locais de coleta foi feita com base nos morfotipos de *Euterpe edulis* encontrados em cada região e nas distâncias geográficas entre elas. No total, foram analisadas oito populações, onde duas se situam no Bioma do Cerrado (Distrito Federal) e seis na Mata Atlântica (Bahia), sendo amostradas as seguintes áreas (TABELA 1 e FIGURA 2).

A seguir estão relacionadas todas as áreas amostradas com uma breve descrição.

1. Parque Nacional de Brasília (PNB-DF): localizado no Bioma Cerrado a noroeste do Distrito Federal, situada a 10 km da capital nacional com área 30.000 hectares.

2. Reserva Ecológica do Roncador (IBGE-DF): localizado no Bioma Cerrado, a centro-sul do Distrito Federal, a cerca de 20 km de Brasília. Sua superfície é de 1.300 hectares.

3. RPPN Serra do Teimoso-BA: situada no município de Jussará, Bahia. Localiza-se no corredor central da Mata Atlântica, na transição entre a floresta úmida no topo de morros e semidecídua para a base.

4. Ecoparque de Una-BA: localiza-se no município de Una, região sul da Bahia. Está situado ao lado da Reserva Biológica de Una, às margens do Rio Maruim. Com 383 hectares de área protegida da Mata Atlântica.

5. Reserva Biológica de Una-BA (Rebio-Una): localizada no Sul da Bahia, município de Una, área com 10.641 hectares. Apresenta características peculiares como endemismo de algumas espécies e a maior taxa de biodiversidade descrita no planeta.

6. RPPN Estação Veracel-BA: ocupa 6.069 hectares, situada no município de Eunápolis, extremo Sul da Bahia. A área está inserida no Corredor Central da Mata Atlântica. Cerca de 80% da área da RPPN é coberta por floresta

primária, ou seja, ambientes que sofreram pouca interferência antrópica. A população encontrada apresenta bainha amarelada, com alguns indivíduos com bainha verde ocorrendo em simpatria.

7. Fazenda Alto da Esperança-BA: situada na Rodovia Ilhéus - Itacaré no Km. A coleta foi feita em um fragmento da Mata Atlântica com aproximadamente 10 hectares.

8. Fazenda Boa Sorte-BA: localizada na Rodovia Uruçuca - Ilhéus, Km 04. A área tem 78 hectares no total e a população de palmito-juçara está situada em um fragmento de Mata Atlântica de 13 hectares.

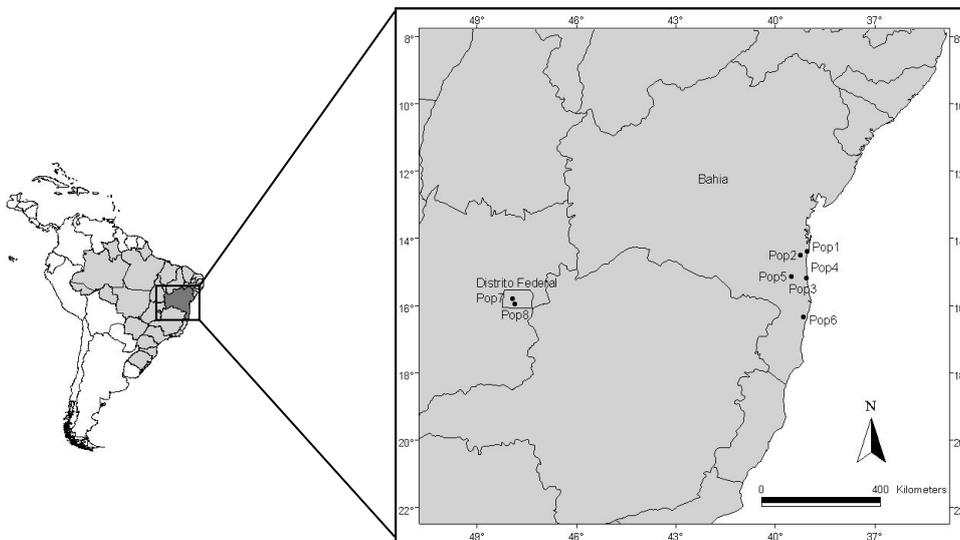
Mais detalhes sobre as áreas estudadas são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Procedência, amostragem e morfotipo dos indivíduos coletados em cada população de *E.edulis*

| Populações                    | Município/UF | Morfotipo      | Localização      | Nº amostras |
|-------------------------------|--------------|----------------|------------------|-------------|
| <b>PNB*</b>                   | Brasília/DF  | Típico/verde   | 15°47'S/ 47°56'W | 28          |
| <b>IBGE*</b>                  | Brasília/DF  | Típico/verde   | 15°56'S/47°52'W  | 33          |
| <b>Serra do Teimoso**</b>     | Jussari/BA   | Típico/verde   | 15°08'S/39°31'W  | 20          |
| <b>Ecoparque de Una**</b>     | Una/BA       | Ecótipo        | 15°10'S/39°03'W  | 33          |
|                               |              | Bahia/vermelho |                  |             |
| <b>Rebio-Una</b>              | Una/BA       | Ecótipo        | 15°10'S/39°04'W  | 40          |
|                               |              | Bahia/vermelho |                  |             |
| <b>Estação Veracel</b>        | Eunápolis/BA | Ecótipo        | 16°20'S/39°10'W  | 16          |
|                               |              | Bahia/amarelo  |                  |             |
| <b>Faz. Alto da Esperança</b> | Itacaré/BA   | Ecótipo        | 14°22'S/39°02'W  | 40          |
|                               |              | Bahia/vermelho |                  |             |
| <b>Faz. Boa Sorte</b>         | Uruçuca/BA   | Ecótipo        | 14°30'S/39°15'W  | 40          |
|                               |              | Bahia/amarelo  |                  |             |

\*Dados de Gaiotto et al.(2003); \*\*Dados cedidos por F.A.Gaiotto

Os dados de genótipos dos 115 indivíduos amostrados nas populações do Ecoparque de Una (BA), Reserva Natural da Serra do Teimoso (BA), Parque Nacional de Brasília (DF) e Reserva Ecológica do Roncador (BA) foram obtidos no desenvolvimento de outros projetos que antecederam essa dissertação e foram cedidos pela autora dos mesmos, Dr<sup>a</sup> Fernanda Amato Gaiotto.



**FIGURA 2.** Localização geográfica das populações de *Euterpe edulis* analisadas. Pop 1: Fazenda Alto da Esperança (Itacaré); Pop 2: Fazenda Boa Sorte (Uruçuca); Pop 3: Rebio-Una; Pop 4: Ecoparque de Una; Pop 5: Reserva Natural Serra do Teimoso; Pop 6: Estação Veracel; Pop 7: PNB; Pop 8: IBGE.

### 3.2. Coleta do Material Vegetal e Extração de DNA

Amostras de tecido radicular de um total de 196 indivíduos adultos foram coletadas em quatro populações naturais situadas no sul da Bahia. O material radicular foi transportado em gelo, e logo após estocado em *freezer* -20°C.

O protocolo utilizado para extração de DNA foi baseado no Protocolo de extração proposto por FERREIRA; GRATTAPAGLIA (1998).

### 3.3. Quantificação do DNA

A quantificação do DNA extraído foi realizada em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio ( $2,5 \times 10^{-4}$  mg/mL). Em cada poço do gel acrescentou-se 2  $\mu$ L de amostra de DNA, 2  $\mu$ L de tampão de corrida (sacarose  $1,6 \text{ mol.L}^{-1}$ , azul de bromofenol  $1,6 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ).

A quantificação foi visualizada por meio de sistema de fotodocumentação Image Quant 350 (GE Healthcare) utilizando como padrão DNA de fago  $\lambda$  nas concentrações de 30, 50 e 100 ng/ $\mu$ L.

### 3.4. Obtenção de Dados Genéticos

O material genético obtido foi amplificado com um total de 14 pares de primers microssatélites nucleares (EE2/ EE5/ EE23/ EE32/ EE9/ EE25/ EE43/ EE45/ EE47/ EE48/ EE52/ EE54/ EE59/ EE63) desenvolvidos por GAIOTTO et al., (2001). Foram utilizados iniciadores *tail* com cerca de 40 pb (OETTING et al., 1995; MISSIAGGIA; GRATTAPAGLIA, 2006). Iniciador com cauda (*tail*) consiste na adição ao primer *forward* de uma extensão ou “cauda” de oligonucleotídeos de 20 pb (*tail*) de seqüência não comum ao genoma estudado. Neste caso foram utilizadas três seqüências iguais a locos do cromossomo Y humano. São utilizadas seqüências complementares de oligonucleotídeos marcados com fluorocromo, denominado iniciador marcado. Três tipos de marcações (HEX, NED e 6-FAM) foram feitas nos iniciadores marcados. Para a amplificação de cada loco foram utilizados o iniciador *forward tail*, o *reverse* e o marcado com o fluorocromo (Tabela 2).

**Tabela 2.** Sequência dos iniciadores *tail* com o respectivo tipo de fluorescência utilizada

| Primer          | Sequência do primer (5' para 3') | Fluorescência na extremidade 5' |
|-----------------|----------------------------------|---------------------------------|
| <b>ORY5437</b>  | GACTATGGGCGTGAGTGCAT             | 6 – FAM                         |
| <b>OG8S1132</b> | GGCTAGGAAAGGTTAGTGCC             | HEX                             |
| <b>OSD12</b>    | ACCAACCTAGGAAACACAGT             | NED                             |

As reações de amplificação via PCR foram realizadas com um volume final de 13  $\mu$ L contendo 7,5 ng de DNA genômico, tampão 1X (Tris-HCl 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mmol/L pH8,3) 0,27  $\mu$ mol/L de cada iniciador (*forward tail*, *reverse* e marcado), 2,0 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mg/mL de BSA, 0,25 mmol/L de dNTP e 1U *Taq* DNA polymerase e água ultrapura estéril, As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: 1 ciclo a 96°C por 2 minutos, 34 ciclos de 94 °C

por 1 minuto, temperatura específica de anelamento do *primer* ( $T_a$  °C) por 1 minuto e 72°C por 1 min. Após os 34 ciclos, uma etapa final de alongamento de 7 minutos a 72°C.

A análise dos amplicons em gel foi feita em sistema multiplex, onde 2 µL de produtos de PCR foram misturados em 3 µL de solução LB-ROX (2 µL de tampão de carregamento 1:5 formamida deionizada e 1 µL de DNA interno padrão marcado com fluorescência) (BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2001). Esta mistura foi desnaturada por 5 minutos a 95°C da qual 2 µL foram utilizados para eletroforese de 2 horas e 30 minutos, conduzida em gel desnaturante (7 mol/L uréia) de poliacrilamida 4% (Long Ranger 50%-Cambrex) em tampão TBE 1X (Tris-base 8,9 mmol/L, ácido bórico 88 mmol/L, EDTA 10 mmol/L).

As eletroforeses dos fragmentos foram realizadas no seqüenciador semi-automático ABI 377 (Applied Biosystems) utilizando-se filtro virtual D. A detecção e a estimativa do tamanho de alelos em pares de base foram realizadas com o uso do programa Genescan® v3.1 (Applied Biosystems). Em seguida os valores foram importados para o Genotyper® v2.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA) para filtragem de picos, interpretação e compilação final dos dados, definindo o genótipo de cada indivíduo. Os dados genéticos foram salvos em uma planilha Excel.

### 3.5. Análises Estatísticas

De posse dos genótipos de cada indivíduo pôde – se obter estimativas de genética descritiva como número médio de alelos por loco ( $A$ ), heterozigosidade esperada ou diversidade gênica ( $H_e$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), alelos exclusivos ( $A_p$ ) e índice de fixação ( $f$ ) (WEIR; COCKERHAM, 1984) a partir do programa GDA (Genetic Data Analysis) (LEWIS; ZAYKIN, 2001). A estimativa do número efetivo de alelos ( $A_e$ ) foi obtida a partir da diversidade gênica das populações ( $H_e$ ) ( $A_e = 1/1 - H_e$ ; NEI, 1987).

Foram calculadas as estatísticas  $F$  (WEIR; COCKERHAM, 1984) e análise de identidade genética entre indivíduos de acordo com Nei (1978) e análise de agrupamento segundo o método UPGMA foram obtidos no programa GDA.

A estimativa de frequências de alelos nulos, admitindo as proporções de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi analisada pelo programa MICRO-CHECKER 2.2.3. de acordo com o método proposto por VAN OOSTERHOUT (2004).

Devido a algumas limitações do  $F_{ST}$  relacionadas ao modelo mutacional de marcadores microssatélites, também foi feita a estimativa de estrutura genética nas populações utilizando o parâmetro  $R_{ST}$  (GOODMAN, 1997) e estimativa de diferenciação genética interpopulacional utilizando o parâmetro  $G'_{ST}$  proposto por HEDRICK (2005) a partir do  $G_{ST}$  obtido no programa FSTAT (GOUDET, 1995).

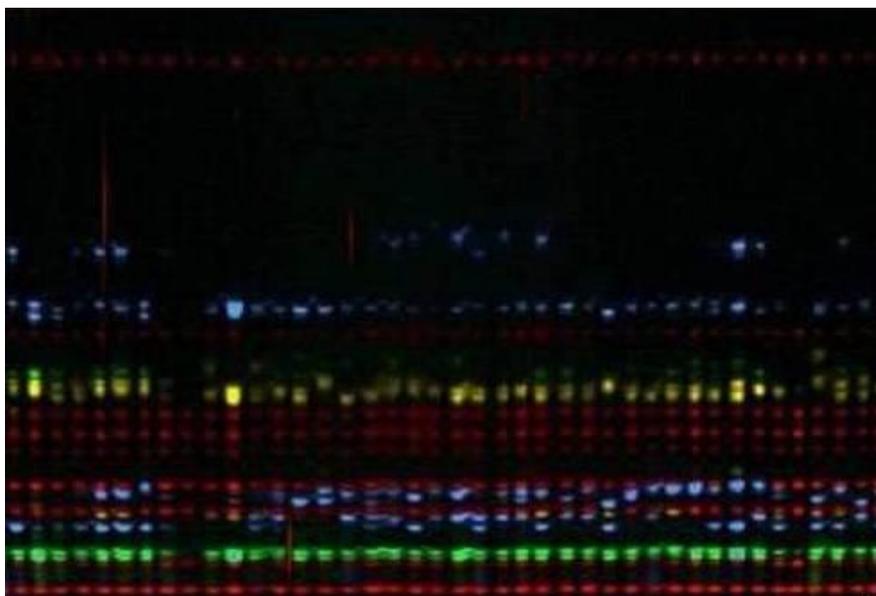
O modelo bayesiano implementado pelo programa Structure (PRITCHARD et al. 2000; FALUSH et al. 2003) foi aplicado para inferir o número de grupos populacionais. A inferência populacional produzida foi executada sem incorporar a informação das populações pré-definidas, para o modelo misto e com frequência correlacionada.

A análise do número de populações (K) foi executada para valores que variaram de 1 a 10 com dez cadeias independentes, cada cadeia com um comprimento de 50.000 iterações, seguida por 100.000 repetições do número de MCMC (cadeia de Markov e Monte Carlo). O  $\Delta K$  (número real de grupos) foi determinado com base na média dos valores de L (K) produzidos para dez repetições para cada K de acordo com método proposto por EVANNO et al. (2005) usando o programa Structure Harvester (EARL, 2009).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Diversidade Genética e Índice de Fixação

Todos os locos apresentaram elevado polimorfismo como exemplificado na FIGURA 3.



**FIGURA 3.** Sistema multiplex em gel de poliacrilamida 4% no seqüenciador ABI377. Análise da população Ecoparque de Una com 5 locos. Fluorescência vermelha: *ladder* marcado com ROX, fluorescência verde: loco EE2 e EE5; fluorescência azul: locos EE59 e EE48; fluorescência amarela: loco EE25.

O número de alelos por população variou de 12 alelos (Estação Veracel) a 32 alelos (Faz. Alto da Esperança) com um total de 298 alelos descritos nos 14 locos de microssatélites analisados nas oito populações. Foi obtido um número médio de alelos por locos de 21,3 (Tabela 3).

Observou-se que a população da Estação Veracel apresentou menor média de alelos por loco ( $A = 5,3$ ) dentre as analisadas, o que pode ser devido à

amostragem de apenas 16 indivíduos nesta população contra uma média de 33 indivíduos das demais. A população de Reserva do Roncador (IBGE) apresentou o maior número médio de alelos por locos com 9,1 alelos. O número efetivo de alelos ( $A_e$ ) obtido foi baixo, chegando a ser a metade do número médio de alelos ( $A$ ) obtido nas populações analisadas, variando de 2,7 a 4,3, indicando distribuição desigual nas frequências alélicas com elevado número de alelos em baixa frequência. A possível presença de alelos nulos foi detectada em todas as populações. A análise da frequência dos alelos nulos em todos os locos para cada população apresentou variação de 0,032 a 0,086, com a maior frequência em populações localizadas no sul da Bahia (Tabela 3).

**Tabela 3.** Estimativas de parâmetros genéticos obtidos para as oito populações de *Euterpe edulis* baseados em 14 locos microssatélites.

| Populações             | Município/UF | $A$ | $An$  | $He$             | $Ho$             | $f$   | $Ae$ | $Ap$ |
|------------------------|--------------|-----|-------|------------------|------------------|-------|------|------|
| Faz. Alto da Esperança | Itacaré/BA   | 8,7 | 0,081 | 0,767<br>(0,004) | 0,541<br>(0,004) | 0,298 | 4,3  | 16   |
| Faz. Boa Sorte         | Uruçuca/BA   | 8,3 | 0,055 | 0,717<br>(0,008) | 0,504<br>(0,004) | 0,300 | 3,5  | 8    |
| Rebio-Una              | Una/BA       | 8,1 | 0,052 | 0,696<br>(0,006) | 0,547<br>(0,004) | 0,217 | 3,3  | 8    |
| Estação Veracel        | Eunápolis/BA | 5,3 | 0,074 | 0,647<br>(0,010) | 0,442<br>(0,009) | 0,323 | 2,8  | 15   |
| Ecoparque de Una       | Una/BA       | 6,6 | 0,058 | 0,689<br>(0,010) | 0,509<br>(0,005) | 0,267 | 3,2  | 12   |
| Serra do Teimoso       | Jussari/BA   | 5,5 | 0,086 | 0,630<br>(0,014) | 0,388<br>(0,007) | 0,391 | 2,7  | 11   |
| PNB-DF                 | Brasília/DF  | 8,4 | 0,032 | 0,765<br>(0,004) | 0,712<br>(0,004) | 0,070 | 4,2  | 10   |
| IBGE-DF                | Brasília/DF  | 9,1 | 0,039 | 0,763<br>(0,005) | 0,664<br>(0,004) | 0,131 | 4,2  | 11   |

$A$ , número médio de alelos por loco;  $An$ , frequência de alelos nulos;  $He$ , Heterozigosidade esperada;  $Ho$ , Heterozigosidade observada;  $f=F_{IS}$ , Índice de fixação;  $Ae$ , número efetivo de alelos;  $Ap$ , alelos exclusivos; () Estimativa do erro padrão.

A diversidade gênica ( $H_e$ ) das populações analisadas variou entre 0,630 e 0,767. A população de Itacaré e as populações do Distrito Federal (PNB e IBGE) apresentaram diversidade gênica com valores próximos entre si e maiores do que as outras populações analisadas, como apresentado na Tabela 3.

A heterozigosidade observada foi bem variável e com valores baixos, sendo maior nas populações do Distrito Federal (PNB com  $H_o$  de 0,712 e IBGE com  $H_o$  de

0,664) do que nas populações situadas no sul da Bahia (Tabela 3), provavelmente devido à presença de alelos nulos nestas populações sul baianas.

No geral, a diversidade gênica foi maior do que a heterozigosidade observada e essa distinção foi refletida nos valores de índice de fixação ( $f$ ), os quais se apresentaram elevados, variando de 0,07 a 0,391, com as populações do Distrito Federal demonstrando menores valores de  $f$  (Tabela 3).

A população da Reserva Natural Serra do Teimoso apresentou o menor índice de diversidade gênica ( $H_e = 0,630$ ) e heterozigosidade observada ( $H_o = 0,388$ ) e conseqüentemente maior índice de fixação ( $f = 0,391$ ) em relação às outras populações (Tabela 3).

Todas as populações apresentaram alelos exclusivos ( $A_p$ ) com um total de 91 alelos exclusivos, com as populações da Fazenda Boa Sorte (Uruçuca) e Rebio-Una apresentando menos alelos exclusivos (8 alelos) do que as outras populações. A população da Fazenda Alto da Esperança (Itacaré) apresentou maior número de alelos exclusivos, com 16 alelos exclusivos nessa população (Tabela 3).

#### 4.2. Estrutura Genética

Os valores das Estatísticas  $F$  (WEIR; COCKERHAM, 1984), obtido em análise conjunta das populações apresentaram índices elevados. Observa-se uma elevada estruturação genética entre as populações analisadas conjuntamente, com  $F_{ST}$  de 0,205. Essa elevada estruturação genética pôde ser comprovada com a estimativa do  $R_{ST}$  (GOODMAN, 1997) e  $G'_{ST}$  (HEDRICK, 2005) apresentando valores de 0,5 e 0,747, respectivamente.

Os valores de  $F_{IT}$  e  $F_{IS}$  estimados foram elevados demonstrando uma provável perda de diversidade genética nas populações, com valor médio do  $F_{IT}$  sendo de 0,384 e valor médio de  $F_{IS}$  de 0,225 (Tabela 4).

**Tabela 4.** Resultados das Estatísticas  $F$  analisando todas as populações.

|              | $F_{IS}$     | $F_{IT}$     | $F_{ST}$     |
|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>Média</b> | <b>0,225</b> | <b>0,384</b> | <b>0,205</b> |
| Erro padrão  | 0,036        | 0,027        | 0,020        |

Ao analisar a diferenciação genética entre pares de populações observou-se que populações com mesmo morfotipo e que se encontram geograficamente próximas (22 km em linha reta), como as populações de morfotipo verde do Distrito Federal, PNB e IBGE, obteve-se baixa estrutura genética ( $R_{ST}$  de 0,06). Porém, ao analisar populações de mesmo morfotipo e que estão distantes em linha reta 87 km, como entre as populações da Fazenda Alto da Esperança (Itacaré) e Ecoparque de Una, ambas do morfotipo vermelho, apresentaram estruturação genética moderada com  $R_{ST}$  de 0,22.

O nível de estrutura genética entre duas populações de morfotipos distintos, como entre Rebio-Una e Serra do Teimoso, que estão distantes geograficamente em 46 km em linha reta, mostrou-se elevado com valor de  $R_{ST}$  de 0,61.

### 4.3. Fluxo Gênico Aparente ou Histórico

Em geral, as estimativas de fluxo gênico entre pares de populações, com base no  $F_{ST}$  (WEIR; COCKERHAM, 1984), foram inferiores a 1,0 migrante por geração para as populações com maiores distâncias geográficas entre si (Tabela 5).

**Tabela 5.** Matriz entre distância geográfica e fluxo gênico aparente com base no  $F_{ST}$ . Na diagonal inferior observa-se os valores estimados de fluxo gênico (Nm). Na diagonal superior estão apresentadas as distâncias (Km) em linha reta entre as populações amostradas.

|   | Faz. Alto da Esperança-Itacaré (vermelho) | Faz. Boa Sorte-Uruçuca (amarelo) | Rebio-Una (vermelho) | Estação Veracel (amarelo) | Ecoparque de Una (vermelho) | Serra do Teimoso (verde) | PNB-DF (verde) | IBGE-DF (verde) |
|---|---|----------------------------------|----------------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------|----------------|-----------------|
| Faz. Alto da Esperança-Itacaré (vermelho) | ---                                       | 38                               | 92                   | 231                       | 87                          | 102                      | 968            | 9667            |
| Faz. Boa Sorte-Uruçuca (amarelo)          | 1,97                                      | ---                              | 67                   | 193                       | 66                          | 64                       | 941            | 939             |
| Rebio-Una (vermelho)                      | 2,10                                      | 1,40                             | ---                  | 130                       | 0,28                        | 46                       | 953            | 952             |
| Estação Veracel (amarelo)                 | 1,13                                      | 0,83                             | 1,35                 | ---                       | 131                         | 130                      | 937            | 916             |
| Ecoparque de Una (vermelho)               | 1,92                                      | 1,35                             | 2,05                 | 0,91                      | ---                         | 49                       | 959            | 949             |
| Serra do Teimoso (verde)                  | 1,27                                      | 0,71                             | 1,10                 | 0,75                      | 1,25                        | ---                      | 910            | 903             |
| PNB-DF (verde)                            | 1,04                                      | 0,65                             | 0,94                 | 0,80                      | 0,91                        | 0,95                     | ---            | 22              |
| IBGE-DF (verde)                           | 0,95                                      | 0,60                             | 0,81                 | 0,64                      | 0,81                        | 0,90                     | 4,60           | ---             |

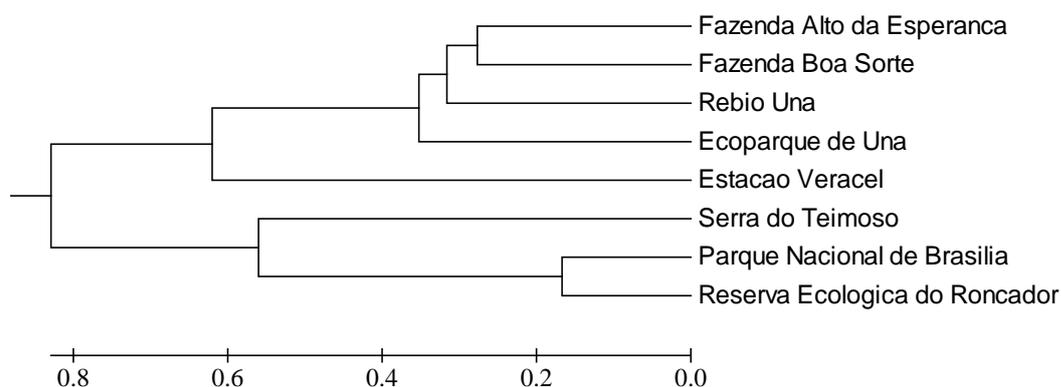
As populações muito próximas geograficamente e do mesmo morfotipo apresentaram elevado fluxo gênico, como no caso das populações do Distrito Federal que distam 22 km entre si e apresentaram fluxo gênico aparente de 4,6 migrantes por geração.

No caso de populações com maior distância entre si e que são do mesmo morfotipo, apresentaram fluxo gênico indireto intermediário, a exemplo das populações da Faz. Alto da Esperança (Itacaré) e Rebio- Una que são do morfotipo vermelho e distam entre si 92 km em linha reta, apresentando 2,1 migrantes por geração.

Em populações que são de morfotipos distintos com distância intermediária apresentaram baixo fluxo gênico entre si, como encontrado entre as populações de Serra do Teimoso e Ecoparque de Una, que distam entre si 49 km em linha reta e apresentaram 1,25 migrantes por geração.

#### 4.4. Agrupamento populacional

Dois grupos principais foram observados na análise de agrupamento pelo método UPGMA utilizando a distância de NEI (1978) obtida pelo programa GDA (FIGURA 4). As populações que apresentam características fenotípicas típicas de populações de *Euterpe edulis*, populações do Distrito Federal e Serra do Teimoso, que são do morfotipo verde, foram agrupadas separadamente das populações do morfotipo vermelho (Fazenda Alto da Esperança, Rebio-Una e Ecoparque de Una) e das populações de indivíduos que apresentam bainha amarelada (Fazenda Boa Sorte e Estação Veracel).



**FIGURA 4.** Agrupamento das populações pelo método *UPGMA* utilizando a distância de NEI (1978).

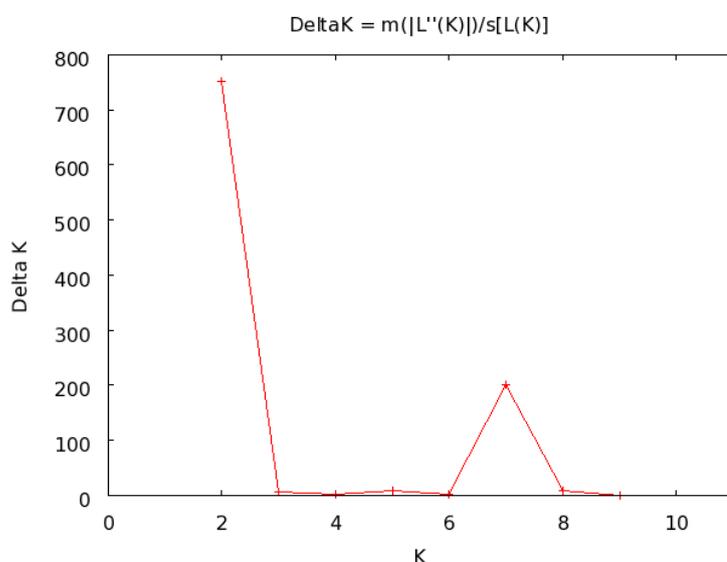
O primeiro grupo foi formado pelas populações da Fazenda Alto da Esperança (Itacaré) agrupada à população da Fazenda Boa Sorte (Uruçuca) e as

populações da Rebio-Una, Ecoparque de Una e Estação Veracel apresentando-se em grupos unitários, com a população da Estação Veracel mais distantes dos outros subgrupos.

O segundo grupo foi subdividido em dois subgrupos com as populações do Distrito Federal (PNB e IBGE) apresentando-se agrupadas e a população da Serra do Teimoso em um subgrupo unitário mais distante.

A análise bayesiana implementada pelo programa Structure foi aplicada com o objetivo de gerar grupos geneticamente homogêneos entre 250 árvores de *Euterpe edulis* pré-definidas em oito populações, com base na localização geográfica. O gráfico da “variação de segunda ordem dos valores médios de máxima verossimilhança para o número de populações K” ( $\Delta K$  proposto por EVANNO et al. (2005).) apresentou variação de 1 a 10 (FIGURA 5).

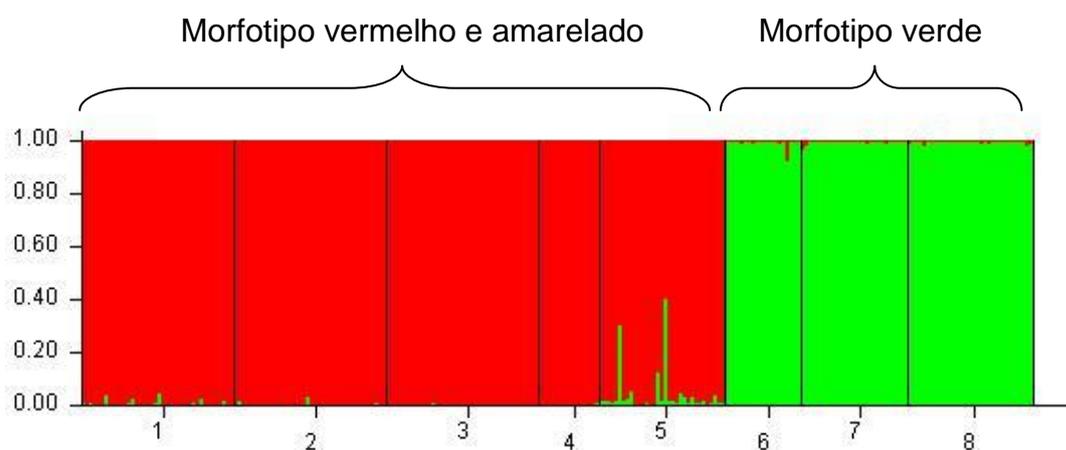
Pode-se observar que a estimativa de números de grupos populacionais gerou dois picos para K=2 e K=7, com valor máximo em K=2.



**FIGURA 5.** Variação de segunda ordem dos valores médios de máxima verossimilhança para o número de populações K em 250 indivíduos de *Euterpe edulis*.

O agrupamento das populações em dois grupos ( $\Delta K=2$ ) demonstraram que eles estão estruturadas geneticamente (FIGURA 6). Em média, a ancestralidade compartilhada entre as árvores de *Euterpe edulis* foi de 98.8 e 99.4% nos grupos marcados com cor vermelha e verde, respectivamente (FIGURA 6). O grupo vermelho foi composto pela totalidade de indivíduos amostrados na Fazenda Alto da

Esperança (Itacaré), na Fazenda Boa Sorte (Uruçuca), na Rebio-Una, na Estação Veracel e no Ecoparque de Una. Enquanto no grupo verde estão todos os indivíduos amostrados no Distrito Federal (PNB e IBGE) e na Reserva Natural Serra do Teimoso.



**FIGURA 6.** Agrupamento das populações pré-definidas à localização geográfica para  $\Delta K = 2$ . Faz.Alto da Esperança (Itacaré)=1; Faz.Boa Sorte (Uruçuca)=2; Rebio-Una=3; Estação Veracel=4; Ecoparque de Una=5; Serra do Teimoso=6; PNB-DF=7; IBGE-DF=8.

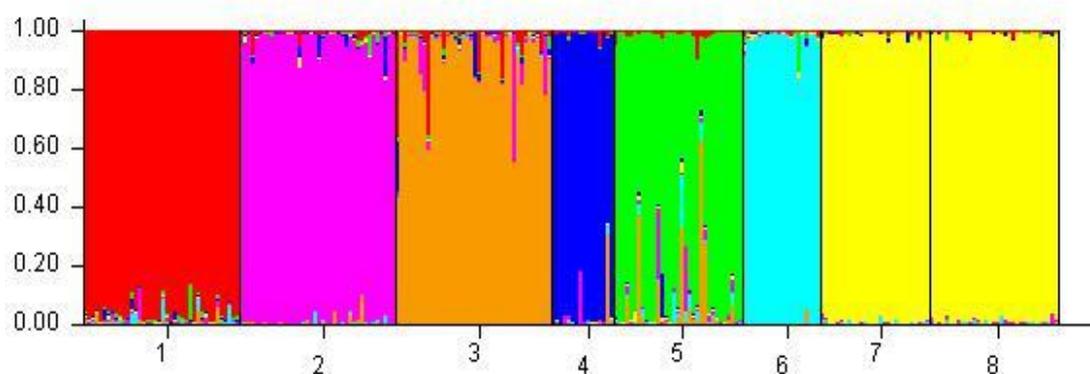
Esses resultados foram condizentes ao agrupamento pelo método UPGMA usando distância de NEI (1978) (FIGURA 4 e 6), o qual agrupou as populações em relação aos diferentes morfotipos do presente estudo.

Na estimativa da proporção de relação de cada população pré-definida com os dois grupos formados ( $K=2$ ), mostrou que as populações do ecótipo Bahia apresentaram elevada probabilidade de estarem agrupados, com Rebio-Una e Estação Veracel ambas com 99.7% de probabilidade, população da Fazenda Boa Sorte (Uruçuca) com 99,6%, Fazenda Alto da Esperança (Itacaré) com 99,2% e Ecoparque de Una com 95,9% de probabilidade de agrupamento. Da mesma forma, as populações do morfotipo verde apresentaram elevadas probabilidades de estarem agrupadas, com PNB-DF e IBGE-DF, ambas possuindo 99,5% de probabilidade e a população do sul da Bahia, Serra do Teimoso, com 99,2% de probabilidade de agrupamento.

Alguns indivíduos da população pré-definida do Ecoparque de Una (grupo 5 na FIGURA 6) apresentaram probabilidade máxima de 40% de possuírem alelos

ancestrais ao grupo de populações com morfotipo verde (indivíduos representados em barras verdes).

A análise de atribuição de indivíduos a um grupo foi feita com base na frequência dos alelos encontrados no grupo e a probabilidade dos indivíduos apresentarem genótipos que pertençam ao grupo em questão. A partir dessa análise, os grupos apresentaram-se subdivididos com indivíduos mistos apresentando alelos ancestrais comuns a outras populações, como pode ser observado na FIGURA 7.



**FIGURA 7.** Atribuição de 250 palmeiras aos grupos populacionais, para  $\Delta K=7$ . ■ Faz. Alto da Esperança (Itacaré); ■ Faz. Boa Sorte (Uruçuca); ■ Rebio-Una; ■ Estação Veracel; ■ Ecoparque de Una; ■ Serra do Teimoso; ■ PNB-DF e IBGE-DF.

A variação de  $\Delta K=7$  demonstrou que as palmeiras amostradas nas populações do Distrito Federal, PNB e IBGE, permaneceram agrupadas geneticamente, com probabilidade média de 97,5% e 97,6%, respectivamente, com indivíduos apresentando menos de 5% de probabilidade de compartilhamento de alelos ancestrais com outros grupos.

Os indivíduos da Fazenda Alto da Esperança (Itacaré) apresentaram probabilidade média de 95,6% de se agruparem. Observou-se que algumas árvores apresentaram menos de 20% de probabilidade de compartilharem alelos ancestrais com grupos (grupo 1 na FIGURA 7). O mesmo pode ser observado no grupo pré-definido da Fazenda Boa Sorte (Uruçuca), onde os indivíduos amostrados apresentaram média de 95,5% de probabilidade de agrupamento e poucos indivíduos compartilharam alelos ancestrais com outros grupos, com menos de 20% de probabilidade (grupo 2 na FIGURA 7).

Os indivíduos amostrados na Rebio-Una apresentaram probabilidade média de 90,6% de se agruparem geneticamente, enquanto que os indivíduos do Ecoparque de Una apresentaram uma média de 86,2% de probabilidade de agrupamento. Ambas as populações pré-definidas apresentaram média de probabilidade de agrupamento inferior aos outros grupos estudados, devido à presença de indivíduos com probabilidades maiores do que 30% de ancestralidade com outros grupos (FIGURA 7). Foi observado que um indivíduo coletado no Ecoparque de Una apresentou 69% de ancestralidade com o grupo da Rebio-Una.

As palmeiras analisadas nas populações da Estação Veracel e Serra do Teimoso apresentaram em média 94,1% e 96,7% de probabilidade de agrupamento, respectivamente. Em ambos os grupos apresentaram-se indivíduos mistos com ancestralidades a outras populações, porém na Serra do Teimoso foram baixas as probabilidades de compartilhamento de alelos ancestrais, com menos de 20%, enquanto que na Estação Veracel, algumas palmeiras apresentaram probabilidade de ancestralidade acima de 20% (FIGURA 7).

## 5. DISCUSSÃO

Muitos estudos têm focado na análise da diversidade genética de populações de espécies arbóreas com objetivo de direcionamento de planos de conservação. Porém, poucos trabalhos científicos tem relacionado distinções fenotípicas entre populações naturais de espécies arbóreas e níveis de estrutura genética entre tais populações. Assim, este trabalho vem contribuir, de maneira inédita, com a observação de diferenças morfológicas e genéticas que indicam um possível início de isolamento reprodutivo e quiçá de especiação em *Euterpe edulis*.

### 5.1. Diversidade Genética e Índice de Fixação

A acurácia na estimativa de parâmetros genéticos baseia-se, principalmente, nas características dos marcadores moleculares escolhidos, tais como elevado nível de polimorfismo e distribuição ampla no genoma. No presente estudo, o marcador SSR demonstrou elevado nível de variação alélica compatível com outros estudos de estrutura genética populacional (ZUCCHI et al. 2003; WANG et al. 2005).

Com base nos 14 locos SSRs foi possível observar que as populações situadas no sul da Bahia apresentaram menor diversidade genética do que as populações localizadas no Distrito Federal (Tabela 3). Entretanto, em ambas as regiões a variabilidade genética detectada foi menor do que a obtida em outros trabalhos realizados com a espécie em questão (GAIOTTO et al. 2003; CONTE et al. 2008; VIEIRA et al. 2010).

A diferença no nível de diversidade genética detectada, pode dever-se à problemas da ferramenta molecular utilizada ao ser transferida para as populações do sul da Bahia, já que os marcadores microssatélites utilizados no presente

trabalho foram desenvolvidos a partir de amostra das populações do Distrito Federal (GAIOTTO et al. 2001). O déficit de heterozigotos observados e possível presença de alelos nulos nas populações da Bahia podem ser um indicativo de tal evento (Tabela 3). Níveis baixos de  $H_e$  e déficit de  $H_o$  também foram observado em estudos realizados por ZUCCHI et al. (2003) e TARAZI et al. (2010) ao analisarem a diversidade e estrutura genética em populações de espécies arbóreas utilizando microssatélites transferidos de outras espécies. O mesmo pode ocorrer quando há transferência de primers microssatélites entre populações bastante divergentes de uma mesma espécie (PLEINES et al. 2009).

A estimativa da frequência de homozigotos elevada nas populações pode se dever à presença de alelos nulos nestas populações (Tabela 3). Estes alelos, por possuírem baixo peso molecular ou mutações nas regiões de anelamento dos primers, não aparecem nos géis. Com isto, muitos indivíduos heterozigóticos são considerados como homozigóticos, acarretando em um número de heterozigosidade observada menor do que o número real (DAKIN; AVISE, 2004). A transferibilidade de primers microssatélites que apresentaram, no geral, maior ocorrência de alelos nulos nas populações do sul da Bahia corrobora a hipótese de forte processo de diferenciação destas populações em relação às demais populações de morfotipo verde, já que demonstrou que há variação na região que flanqueia os microssatélites no genoma, região essa que, teoricamente, seria conservada dentro da espécie.

Os baixos índices de heterozigosidade observada em relação à diversidade gênica acarreta a valores de índice de fixação positivo, indicando ocorrência de acasalamento não aleatório dentro das populações. Porém, no presente trabalho, provavelmente, a presença de alelos nulos nas populações do sul da Bahia levaram a estimativa de  $f$  elevada. Ou seja, a maior porção do valor de  $f$  positivo estaria ocorrendo devido à ferramenta molecular utilizada e não à endogamia relacionada ao sistema reprodutivo nestas populações sul baianas. Hipotetiza-se que se primers microssatélites fossem desenvolvidos especificamente para estas populações, as mesmas apresentariam valores de  $f$  similares a outros já publicados (GAIOTTO et al. 2003; CONTE et al. 2008) para *E. edulis*.

Deve-se levar em consideração, ainda, a possibilidade de não terem sido amostrados todos os genótipos representativos de cada loco já que o tamanho amostral das populações foi relativamente baixo (média de 31 indivíduos por

população) e a espécie apresenta elevada densidade populacional. Esse aspecto é particularmente importante em estudos genéticos populacionais, uma vez que o uso de locos hipervariáveis pode afetar a acurácia das estimativas de parâmetros genéticos, acarretando em resultados tendenciosos (HEDRICK, 1999).

## 5.2. Estrutura Genética, Fluxo Gênico e Agrupamento Populacional

O resultado do índice de diferenciação genética interpopulacional ( $F_{ST}$ ), de todas as populações analisadas conjuntamente, evidenciou uma significativa estrutura genética, o que pode levar a uma redução na variabilidade genética populacional (Tabela 4). Os resultados estimados de  $F_{ST}$ ,  $R_{ST}$  e  $G'_{ST}$  apresentaram valores diferentes devido às diferenças no modelo estatístico de estimação de cada parâmetro, porém a interpretação biológica dos níveis de estrutura genética presente e significativo nas populações de *E.edulis* é a mesma para os três parâmetros.

Esse elevado nível de diferenciação genética entre as populações pode ser uma consequência da distância geográfica entre os indivíduos analisados e da consequente deriva genética. Tomando como base o grupo de populações analisadas no sul da Bahia e a distância geográfica entre o grupo de populações localizado no Distrito Federal, os quais distam entre si mais de 900 km e considerando-se a presença de uma área ampla fragmentada entre as duas regiões, é improvável que esses grupos estejam conectados por fluxo gênico, mesmo que indireto através do modelo alpondras (*stepping stone*).

Essas divergências puderam ser comprovadas quando se observou o número de alelos exclusivos nas populações. Alelos exclusivos são alelos que só são encontrados em uma população e sua presença é um dos indícios de que fluxo gênico é muito baixo ou inexistente e as mesmas estão se divergindo, aumentando a estrutura genética entre elas (HARLT; CLARK, 1997).

Ao analisar as populações em pares, levando-se em consideração o morfotipo encontrado em cada localidade e a distância geográfica entre elas, foi possível observar que ambos os fatores (distância geográfica e distinções fenotípicas) estão relacionados ao nível de diferenciação genética entre as populações, visto que os níveis de fluxo gênico ( $Nm$ ) obtido a partir do  $F_{ST}$  apresentaram a mesma relação (Tabela 5).

A relação entre divergência genética e distâncias geográficas é observada quando comparamos o nível de estrutura genética encontrada entre populações geograficamente distantes, porém com mesmo morfotipo (Fazenda Alto da Esperança e Ecoparque de Una com 87 km de distância, em linha reta) e populações localizadas em áreas próximas e que apresentam distinções fenotípicas (Fazenda Alto da Esperança e Reserva Natural Serra do Teimoso com 46 km de distância em linha reta). Na primeira situação, o nível de estrutura genética foi menor do que na segunda, mostrando que populações de morfotipos distintos apresentaram divergências genéticas mesmo quando próximas fisicamente, ocasionadas provavelmente pelo isolamento reprodutivo entre os diferentes morfotipos.

Não há estudos publicados relatando elevada estruturação genética entre populações de palmito-juçara que estejam geograficamente próximas, como o obtido no presente estudo. Em análises de diferenciação genética interpopulacional em populações desta espécie utilizando diferentes marcadores moleculares, tais como isoenzimas (REIS et al., 1997), AFLP (CARDOSO et al., 2000) e microssatélites (GAIOTTO et al., 2003; CONTE et al., 2008) foram obtidos níveis baixos de divergência genética entre populações, mesmo quando estas se localizavam bastante afastadas geograficamente (populações distantes 512 km em CARDOSO et al., 2000; populações distantes 150 km em CONTE et al., 2008). Todos os estudos foram realizados nas regiões sudeste, centro-oeste e sul do Brasil, onde o impacto da fragmentação ambiental é maior e mais antigo do que a fragmentação observada no sul da Bahia. Isso indica que as divergências entre populações de palmito-juçara com diferentes morfotipos não se deve à fragmentação e sim a um evento de isolamento reprodutivo de ocorrência natural.

A região sul da Bahia apresenta o domínio da Mata Atlântica mais conservada e diversificada do Brasil, apresentando elevado nível de endemismo de espécies da flora (THOMAS et al., 1998; MARTINI et al., 2007), sendo referida como um ponto de divergência para algumas espécies (PAGLIA, 2003; LARA-RUIZ et al., 2008). Este elevado índice de diferenciação genética em espécies de diferentes táxons nesta região pode estar relacionado a características climáticas, a composição do solo e, principalmente a história geológica da região.

A hipótese de isolamento reprodutivo entre os morfotipos torna-se mais robusta com os resultados de fluxo gênico obtidos no presente estudo. Observaram-se taxas de fluxo gênico histórico maiores entre populações que apresentam fenótipos relativos à cor da bainha similares, mesmo quando as distâncias geográficas entre elas são maiores do que entre populações de morfotipos diferentes (Tabela 5).

Em plantas, o grau de isolamento entre populações depende do fluxo gênico através de polinização e dispersão de sementes (RABASA et al. 2009). Em espécies nas quais as flores são polinizadas por insetos e os frutos são dispersos por aves, o fluxo gênico pode ser extenso ou pode ter um potencial limitado, vai depender do comportamento mutualista do animal (AGUILAR et al. 2008). No caso das populações de palmito-juçara, diferenças no período de florescimento seriam suficientes para acarretar num baixo fluxo gênico entre populações próximas. Uma hipótese seria que ao longo de sua evolução, tais populações teriam entrado em “isolamento por tempo” (IBT) que se refere à restrição temporal de fluxo gênico devido a períodos reprodutivos distintos (HENDRY; DAY, 2005), ou polinização por espécies diferentes e como consequência, as populações não trocam genes e isso acelera o processo de isolamento reprodutivo com consequente divergências genéticas e fenotípicas entre as populações. Para comprovar esta hipótese, estudos comparativos de fenologia da espécie considerando os seus diversos morfotipos e cruzamentos controlados poderiam ser propostos.

A abordagem bayesiana implementada no Structure reforça o indício de isolamento genético existente entre os diferentes morfotipos de *E. edulis*. Primeiramente, as populações foram separadas em dois principais grupos (FIGURA 5) com elevada probabilidade (>98%), com cada um apresentando maior ancestralidade genética entre grupos com mesmo morfotipo.

Tal fato não foi encontrado em outros trabalhos com espécies vegetais (TSUDA; IDE, 2005; CAETANO et al. 2008; BAKKER et al. 2009) onde agrupamento feito pelo método bayesiano agrupou as populações com base na localização geográfica devido ao nível de fluxo gênico e diferenciação genética existente entre elas. No presente trabalho, o primeiro agrupamento das populações não foi condizente com as localizações geográficas, sendo que a população da Reserva Natural Serra do Teimoso agrupou-se com as populações do Distrito Federal, o que

corroborou com resultado de agrupamento pelo método UPGMA (FIGURA 4 e 6), por apresentar semelhança fenotípica e conseqüentemente maior relação genética com as populações de Brasília.

Os dois principais grupos demonstraram estar subdivididos com presença de indivíduos com alelos ancestrais a outros grupos (FIGURA 7). A subdivisão dos grupos foi condizente com as áreas geográficas pré-definidas, onde os indivíduos apresentaram elevada probabilidade de agrupamento (>85%) devido à maior relação genética, indicando o elevado nível de estrutura genética entre as populações.

As populações do Distrito Federal permaneceram no mesmo grupo, possivelmente devido à taxa de fluxo gênico relevante, já que foram as populações que apresentaram maior taxa de migrantes por geração, quando comparadas às outras populações.

A presença de indivíduos mistos com ancestralidade genética a outros grupos está relacionada à taxa de fluxo gênico estimada entre as populações, onde aquelas que apresentaram indivíduos com maior probabilidade de ancestralidade com outros grupos foram as que demonstraram maior conectividade genética (i.e. população Rebio-Una e Ecoparque de Una) (Tabela 5 e FIGURA 7). Essa relação pode ter ocorrido porque o tipo de estimativa de fluxo gênico utilizado (a partir do  $F_{ST}$ ) não é referente a uma taxa de migração recente demonstrando os índices de alelos ancestrais que ainda permaneciam nas populações.

No geral, as populações de palmito-juçara analisadas apresentaram divergência genética, com elevadas estruturação genética entre populações e baixo fluxo gênico com distinções fenotípicas, indicando um provável início de isolamento reprodutivo.

O ecótipo Bahia não apresenta ocorrência em outras regiões do Brasil. Os resultados ora apresentados demonstraram forte divergência genética entre estas populações e aquelas típicas de *E. edulis*. Se a hipótese de isolamento reprodutivo das populações do ecótipo Bahia com populações de morfotipo verde estiver correta, este trabalho foi realizado num momento da evolução em que se inicia um evento natural de especiação.

Assim, os resultados deste trabalho ressaltam a importância do desenvolvimento de planos de conservação, não só das populações de *E. edulis* raras e endêmicas do sul da Bahia (com morfotipo vermelho), mas de todas as

populações analisadas da espécie, pois de forma geral, apresentaram divergências genéticas importantes que podem acelerar a perda da variabilidade genética. Primeiramente, é necessário cessar a fragmentação ambiental e conservar o potencial evolutivo das populações evitando a perda de alelos por deriva genética, pois a capacidade de uma espécie em se adaptar às mudanças ambientais, mesmo sendo elas decorrentes de eventos naturais, está relacionada à quantidade de diversidade genética intra e interpopulacional.

Para melhor compreensão dos fatores influenciando o isolamento reprodutivo entre os diferentes morfotipos, é de grande valia compreender a história biogeográfica do sul da Bahia, avaliar a distribuição genética espacial intrapopulacional dessas populações, os períodos de florescência das populações e espécies de polinizadores que atuam na dispersão gênica de cada população. Distinções de espécies polinizadoras podem atuar no isolamento reprodutivo, com consequente evento de especiação após várias gerações (WIDMER et al. 2009).

Os resultados obtidos no presente trabalho representam o primeiro passo para a compreensão dos processos evolutivos da espécie *Euterpe edulis*, direcionando para estudos mais aprofundados sobre o isolamento reprodutivo entre as populações com distinções fenotípicas e consequente desenvolvimento de planos de conservação do morfotipo endêmico da Mata Atlântica do sul da Bahia.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

- 1) As oito populações de *E. edulis* analisadas possuem diferenças tanto morfológicas quanto moleculares;
- 2) Tanto a estrutura genética, o fluxo gênico estimados quanto o agrupamento das populações demonstram haver mais diferença e isolamento entre populações próximas, porém com morfotipos distintos do que entre populações distantes de mesmo morfotipo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, R.; QUESADA, M.; ASHWORTH, L.; HERRERIAS-DIEGO, Y.; LOBO, J. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 5177–5188, 2008.

ANDERSSON, S. Floral variation in *Saxifraga granulata*: phenotypic selection, quantitative genetics and predicted response to selection. **Heredity**, v. 77, p. 217–223, 1996.

BAKKER, E.G.; MONTGOMERY, B.; NGUYEN, T.; EIDE, K.; CHANG, J.; MOCKLER, T.C.; LISTON, A.; SEABLOOMS, E.W.; BORER, E.T. Strong population structure characterizes weediness gene evolution in the invasive grass species *Brachypodium distachyon*. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 2588-2601, 2009.

BATISTA, J.L.F.; VETTORAZZI, C.; COUTO, H.T.Z. **Levantamento do estoque de palmitreiro (*Euterpe edulis*) na Região do Vale do Ribeira**. Piracicaba: IPEF, p. 219, 2000.

BOVI, M.L.A.; CARDOSO, M. Conservação de sementes de palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart.). **Bragantia**, v. 37, p. 65-71, 1978.

BOVI, M.L.A. Pesquisa em desenvolvimento com o açazeiro no Instituto Agrônômico. Estado de São Paulo. **O Agrônômico, Campinas**, v.36, n. 2, p. 155-178, 1984.

BOVI, M.L.A.; DIAS, G.S. Biologia Floral do palmitheiro (*Euterpe edulis* Mart.) In: **Congresso Nacional de Botânica**, 37, Ouro Preto, p.34, resumos. 1986.

BOVI, M.L.A.; GODOY-JÚNIOR, G.; SAES, L.A. Híbridos interespecíficos de palmitheiro (*Euterpe oleracea* x *Euterpe edulis*). **Bragantia**, v. 46, n. 2, p. 343-363, 1987.

BOVI, M. L. A.; GODOY JÚNIOR, G.; SAES, L.A. Pesquisas com os gêneros *Euterpe* e *Bactris* no Instituto Agronômico de Campinas. **O Agrônomo**, v. 39, n. 2, p. 129-174, 1987b.

BORÉM, R.A.T.; OLIVEIRA FILHO, A.T. Fitossociologia do estrato arbóreo em uma toposequência alternada de mata atlântica, no município de Silva Jardim-RJ, Brasil. **Revista Árvore**, v. 26, n. 6, p. 727-742, 2002.

BRADSHAW, H.D.; SCHEMSKE, D.W. Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. **Nature**, v. 426, p. 176–178, 2003.

BRONDANI, R.P.; GRATTAPAGLIA, D. Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. **Biotechniques**, v. 31, n. 4, p. 793-800, 2001.

CAETANO, S.; PRADO, D.; PENNINGTON, R.T.; BECK, S.; OLIVEIRA-FILHO, A.; SPICHIGER, R.; NACIRI, Y. The history of seasonally dry tropical forests in eastern South America: inferences from the genetic structure of the tree *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). **Molecular Ecology**, v. 17, p. 3147-3159, 2008.

CALZAVARA, B.B.G. **As possibilidades do açaizeiro no estuário amazônico**. Belém: FCAP. V. 5, 103p.1972.

CARDOSO, S.R.S.; ELOY, N.B.; PROVAN, J.; CARDOSO, M.A.; FERREIRA, P.C.G. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. Populations estimated by AFLP analysis. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1753–1760, 2000.

CHARI, J.; WILSON, P. Factors limiting hybridization between *Penstemon spectabilis* and *Penstemon centranthifolius*. **Canadian Journal of Botany**, v.79,n.12, p.1439-1448, 2001.

COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 2, p. 349 – 356, 2001.

CONDIT, R. AND HUBBELL, H. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. **Genome**, v. 34, p. 66-71, 1991.

CONTE, R.; REIS, M.S.; MANTOVANI, A.; VENCOSKY, R. Genetic Structure and Mating System of *Euterpe edulis* Mart. Populations: A Comparative Analysis Using Microsatellite and Allozyme Markers. **Journal of Heredity**, p. 1-7, 2008.

COYNE J.A.; ORR H.A. **Speciation**. Sinauer Associates: Sunderland, MA. 2004.

DAKIN, E.E.; AVISE, J.C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, v. 93, p. 504-509, 2004.

DOBZHANSKY T. **Genetics of the Evolutionary Process**. Columbia University Press: NY. 1970. In: RIDLEY, M. **Evolução**. 3. ed. Porto Alegre Artmed, 752 p. 2006.

EARL, D.A. Structure Harvester v.03, from website: [http://users.soe.ucsc.edu/~dearl/software/struct\\_harvest/](http://users.soe.ucsc.edu/~dearl/software/struct_harvest/)

EISEN J.A. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER, C. *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds), pp. 34-48. **Oxford University Press, Oxford**. 1999.

ELLSTRAND, N.C.; WHITKUS, R.; RIESEBERG, L.H. Distribution of spontaneous plant hybrids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 5090-5093, 1996.

ENDLER, J.A. **Geographic Variation, Speciation, and Clines**. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 1977.

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

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, v. 164, p. 1567-1587, 2003.

FELSENSTEIN, J.; The theoretical population genetics of variable selection and migration. **Annu. Rev. Genet.**, v. 10, p. 253-280, 1976.

FERNANDES, H.Q.B. Uma nova espécie de *Euterpe* (Palmae - Arecoideae - Arecaceae) do Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 3, n. 2, p. 43-49, 1989.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3<sup>o</sup> Ed. Embrapa-Cenargen, 1995. 220 p.

FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. FUNPEC-RP, 2<sup>o</sup> edição Ribeirão Preto, 630p, 2002.

GAIOTTO, F.A.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for Heart of Palm - *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Palmae). **Molecular Ecology Notes**, 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. 94, n. 1, 2003.

GALETTI, M; ALEIXO, A. Effects of palm heart harvesting on avian frugivores in the Atlantic rain forest of Brazil. **Journal of applied Ecology**, v. 35, p. 286-293, 1998.

GLASMAN, S.F. **A revision of B.E. Dalgrens Index of American Palms.** Phanerogamarum Monographiae Tomus VI. 294 p. Lehre, J. Cramer. 1972.

GOODMAN, S.J. R<sub>ST</sub> Calc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 881-885, 1997.

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

HANCOCK, J.M. Simple sequences and the expanding genome. **BioEssays**, v. 18, p. 421–425, 1996.

HARLT, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of population genetics.** Sunderland, Mass.: Sinauer, 3<sup>o</sup> edition, 542p., 1997.

HEDRICK, P.W. Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. **Evolution**, v. 53, n. 2, p. 313-318, 1999.

HEDRICK, P.W. **Genetics of populations.** Boston: Jones and Bartlett Publishers, 2<sup>o</sup> edition. 553p, 2001.

HEDRICK, P.W. A standardized genetic differentiation measure. **Evolution**, v. 59, n. 8, p. 1633-1638, 2005.

HEGARTY, M.J.; HISCOCK, S.J. Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies. **New Phytologist**, v.165, p.411-423, 2005.

HENDERSON, A. **The palms of the Amazon**. Oxford: University Press, 1995. 362p.

HENDERSON, A.; LAEANO, G.; BERNAL, R. **Field guide to the palms of the Americas**. Princeton University Press, New Jersey. 1995.

HENDRY, A.P.; DAY, T. Population structure attributable to reproductive time: isolation by time and adaptation by time. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 901-916, 2005.

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.; SOUZA, L.M.I. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **IPREF**, v. 12, n. 32, p. 65 – 70, 1998.

KAHN, F.; GRANVILLE, J. Palms in forest ecosystems of Amazonia. **Ecological Studies**, New York, n.95, 226p. 1992.

KASHI, Y.; KING, D.; SOLLER, M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. **Trends Genet.**, v. 13, p. 74–78, 1997.

KAY, K.M. Reproductive isolation between two closely related hummingbird-pollinated neotropical gingers. **Evolution**, v. 60, p. 538–552, 2006.

LARA-RUIZ, P.; CHIARELLO, A.G.; SANTOS, F.R. Extreme population divergence and conservation implications for the rare endangered Atlantic Forest sloth, *Bradypus torquatus* (Pilosa: Bradypodidae). **Biological conservation**, v.141, n.5, p.1332-1342, 2008.

LEÃO, M.; CARDOSO, M. **Instruções para a cultura do palmitero**. Campinas: IAC/SUDELPA, 18p. 1974.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d15). Programa distribuído gratuitamente pelos autores. Disponível em: <http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/>, 2000.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 398-401, 1989.

LIU, Z.W.; BIYASHEV, R.M.; SAGHAI MAROOF, M.A. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, n. 5-6, p. 869-876, 1996.

MANTOVANI, A. Fenologia e aspectos da biologia floral de uma população de *Euterpe edulis* na Floresta Atlântica do Sul do Brasil. 1998. 66 f. Dissertação (Mestrado) – UNESP, Rio Claro. In: Reis, M. S.; Reis, A. (Ed.). *Euterpe edulis* Martius – (palmitero): biologia, conservação e manejo. Itajaí: **Herbário Barbosa Rodrigues**, p. 1-22, 2000.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, P. Fenologia da floração, frutificação, mudança foliar e aspectos da biologia floral. **Sellowia**. v. 49-52, p. 23-28, 2000.

MARTINI, A.M.Z.; FIASCHI, P.; AMORIM, A.M.; PAIXÃO, J.L. A hot-point within a hot-spot: a high diversity site in Brazil's Atlantic Forest.. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, p. 3111-3128, 2007.

MAYR, E. **Animal species and evolution**. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA. 1963. In: RIDLEY, Mark. **Evolução**. 3. ed. Porto Alegre Artmed, 752 p. 2006.

MAYR, E., **Populations, Species, and Evolution**, Cambridge, Massachusetts: Harvard Univ. Press, 1970.

MEIRA NETO, J. A. A. et al. Origem, sucessão e estrutura de uma floresta de galeria periodicamente alagada em Viçosa-MG. **Revista Árvore**, v. 27, n. 4, p. 561-574, 2003.

MELO S.C.O.; GAIOTTO, F.A.; CUPERTINO, F.B.; CORRÊA, R.X.; REIS, A.M.M.; GRATTAPAGLIA, D.; BRONDANI, R.P.V. Microsatellite markers for *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), a tree that named a country. **Conservation Genetic**, v. 8, n. 6, p. 1269-1271, 2007.

METZGAR, D.; BYTOF, J.; WILLS, C. Selection Against Frameshift Mutations Limits Microsatellite Expansion in Coding DNA. **Genome Research**, v. 10, p. 72-80, 2000.

MISSIAGGIA, A.; GRATTAPAGLIA, D. Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers. **Genetics and Molecular Research**, v. 5, n. 1, p. 72-78, 2006.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, v. 30, p. 194-200, 2002.

MOYLE, L.C.; OLSON, M.S.; TIFFIN, P. Patterns of reproductive isolation in three angiosperm genera. **Evolution**, v. 58, p. 1195–1208, 2004.

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

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 512p. 1987.

OETTING, W.S.; LEE, H.K.; FLANDERS, D.J.; WIESNER, G.L.; SELLERS, T.A.; KING, R.A. Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. **Genomics**, v. 30, p. 450-458, 1995.

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

PAGLIA, A.P. Análises de viabilidade populacional: quantos indivíduos? Serão eles suficientes? Estudo de caso para espécies ameaçadas da Mata Atlântica do sul da Bahia. IN: CHOMITZ, K.M.; ALGER, K.; THOMAS, T.S.; ORLANDO, H.; NOVA, P.V. Opportunity costs of conservation in a biodiversity hotspot: the case of southern Bahia. **Environment and Development Economics**, v.10, p.293-312, 2005.

PLEINES, T.; JAKOB, S.S.; BLATTNER, F.R. Application of non-coding DNA regions in intraspecific analyses. **Plant Systematics and Evolution**, v. 282, n. 3-4, p. 281-294, 2009.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germoplasm analysis. **Molecular Breeding**, v. 2, n. 3, p. 225-238, 1996.

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

RABASA, S.G.; GUTIERREZ, D.; ESCUDERO, A. Temporal variation in the effects of habitat fragmentation on reproduction of the Mediterranean shrub *Colutea hispanica*. **Plant Ecology**, v. 200, p. 241–254, 2009.

RAMSEY J.; BRADSHAW, H.D.; SCHEMSKE, D.W. Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). **Evolution**, v. 57, p. 1520–1534, 2003.

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, A. Dispersão de sementes de *Euterpe edulis* Martius (Palmae) em uma floresta ombrófila densa montana da encosta atlântica em Blumenau-SC. 1995. 154 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas. In: Reis, M. S.; Reis, A. (Ed.). *Euterpe edulis* Martius – (palmitreiro): biologia, conservação e manejo. Itajaí: **Herbário Barbosa Rodrigues**, p. 1-22, 2000.

REIS, A.; KAGEYAMA, P.Y. Dispersão de sementes de *Euterpe edulis* Martius. In: REIS, M.S.; REIS, A. (Ed.). *Euterpe edulis* Martius – (palmitreiro): biologia, conservação e manejo. Itajaí: **Herbário Barbosa Rodrigues**, p. 60-92, 2000.

REIS, M.S. DOS; GUIMARÃES, E.; OLIVEIRA, G.P. Estudos preliminares da biologia reprodutiva do palmitreiro (*Euterpe edulis*) em mata residual do Estado de São Paulo. In. Congresso Florestal Brasileiro, 7. Curitiba, 1993. Anais. Curitiba, EMBRAPA, p. 358-360,1993.

REIS, M.S. DOS; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Management of Natural populations and maintenance of genetic diversity. In: Workshop on Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation in Management. Florianópolis, 1997. Proceedings – Stockolm: IFS, p.145-156. 1998.

REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. **Projeto Madeira de Santa Catarina**. Itajaí, Sudestesul, 320p. 1978.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3. ed. Porto Alegre Artmed, 2006. 752 p.

RÖDER, M.S.; PLASCHKE, J.; KÖNIG, S.U.; BÖRNER, A.; SORRELLS, M.E.; TANKSLEY, S.D.; GANAL, M.W. Abundance, variability and chromosomal location of

microsatellites in wheat. **Molecular and General Genetics**, v. 246, n. 3, p. 327-333, 1995.

SAVOLAINEN, V.; ANSTETT, M.C.; LEXER, C.; HUTTON, I.; CLARKSON, J.J.; NORUP, M.V.; POWELL, M.P.; SPRINGATE, D.; SALAMIN, N.; BAKER, W.J. Sympatric speciation in palms on an oceanic island. **Nature**, v. 441, p. 210-213, 2006.

SCOPECE, G.; WIDMER, A.; COZZOLINO, S. Evolution of postzygotic reproductive isolation in a guild of deceptive orchids. **American Naturalist**, v. 17, p. 315–326, 2008.

SEBBENN, A. M.; CARVALHO, A.C.M.; FREITAS, M.L.M.; MORAES, S.M.B.; GAINO, A.P.S.C.; SILVA, J.M DA; JOLIVET, C.; MORAES, M.L.T. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, p. 1-12, 2010.

SEOANE, C.E.S.; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Sistema de reprodução em duas populações naturais de *Euterpe edulis* M. sob diferentes condições de fragmentação florestal. **Scientia forestalis**, v. 69, p. 13-24, 2005.

SILVA, M.G.C.P.C.; MARTINI, A.Z.; QUINTINO, R.A. Estrutura populacional de *Euterpe edulis* Mart. No Sul da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n. 2, p. 393-403, 2009.

SLATKIN, M. Gene flow and selection in a two-locus system. **Genetics**, v. 8, p. 209–222, 1975.

STRAND, M.; PROLLA, T.A.; LISKAY, R.M.; PETES, T.D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**, v. 365, p. 274–276, 1993.

TARAMINO, G.; TINGEY, S. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. **Genome**, v. 39, n. 2, p. 277-287, 1996.

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

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple DNA sequences of *Drosophila virilis* isolated by screening with RNA. **J. Mol. Biol.**, v. 172, p. 229-235, 1984.

TAUTZ, D.; SCHLÖTTERER, C. Simple sequences. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 4, p. 832–837, 1994.

THOMAS, W.W.; CARVALHO, A.M.V. DE; AMORIM, A.M.A.; GARRISON, J.; ARBALÁEZ, A.L. Plant endemism in two forests in southern Bahia, Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v.7, p.311–322, 1998.

TSUDA, Y.; IDE, Y. Wide-range analysis of genetic structure of *Betula maximowicziana*, a long-lived pioneer tree species and noble hardwood in the cool temperate zone of Japan. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 3929-3941, 2005.

VIEIRA, F.A.; CARVALHO, D.; HIGUCHI, P.; MACHADO, E.L.M.; SANTOS, R.M. Spatial pattern and fine-scale genetic structure indicating recent colonization of the palm *Euterpe edulis* in a brazilian atlantic forest fragment. **Biochemical genetic**, v. 48, p. 96-103, 2010.

WANG, L.; JUJI,T.; TOKUNAGA, K.; TAKAHASHI, K.; KUWATA, S.; UCHIDA, S.; TADOKORO, K.; TAKAI, K. Polymorphic Microsatellite Markers for the Diagnosis of Graft-versus-Host Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 6, p. 398-401, 1994.

WANG, Y.; LUO, J.; XUE, X.; KORPELAINEN, H.; LI, C. Diversity of microsatellite in the populations of *Picea asperata* originating from the mountains of China. **Plant Science**, v. 168, p. 707-714, 2005.

WAPLES, R. S. A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes. **Evolution**, v. 41, p. 385-400, 1987.

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

WEIR, B.S. **Programa: Genetic Data Analysis II (software)**. Sinauer Associates Sunderland, MA, 1996. 445p.

WIDMER, A.; LEXER, C.; COZZOLINO, S. Evolution of reproductive isolation in plants. **Heredity**, v. 102, p. 31-38, 2009.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v. 28, p. 114-138, 1943.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 323-354, 1951.

YANG, C.F.; GITURU, R.W.; GUO, Y.H. Reproductive isolation of two sympatric louseworts, *Pedicularis rhinanthoides* and *Pedicularis longiflora* (Orobanchaceae): how does the same pollinator type avoid interspecific pollen transference. **Biol J Linn. Soc Lond**, v. 90, p. 37-48, 2007.

ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.P.V.; PINHEIRO, J.B.; LÁZARO JOSÉ CHAVES, L.J.; COELHO, A.S.G.; VENCOSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 449-457, 2003.

