

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FLORESTAIS E DA MADEIRA

MARIANA CARDOZO DE MORAES

DIVERSIDADE GENÉTICA DE PROGENITORES E PROGÊNIES DE
EUTERPE EDULIS MART.

JERÔNIMO MONTEIRO
ESPÍRITO SANTO

2018

MARIANA CARDOZO DE MORAES

DIVERSIDADE GENÉTICA DE PROGENITORES E PROGÊNIES DE
EUTERPE EDULIS MART

Monografia apresentada ao
Departamento de Engenharia
Florestal da Universidade Federal
do Espírito Santo, como requisito
parcial para a obtenção do título
de Engenheiro Florestal

JERÔNIMO MONTEIRO

ESPÍRITO SANTO

2018

MARIANA CARDOZO DE MORAES

Diversidade genética em progenitora e progênes de *Euterpe edulis* Mart.

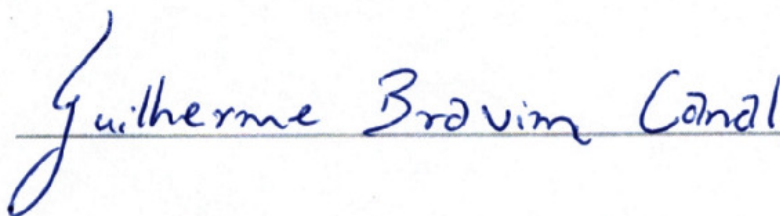
Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro Florestal.

Aprovada em12..... deJulho.....de 2018

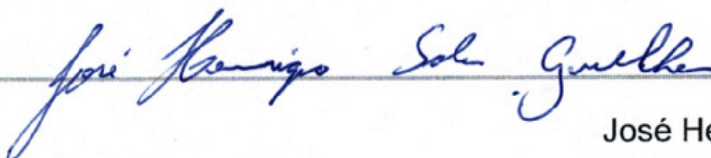
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof.Dr. Ádesio Ferreira
DPV/CCAUE/UFES



Guilherme Bravin Canal
DPV/CCAUE/UFES



José Henrique Soler Guilhen
DPV/CCAUE/UFES

Dedico este trabalho aos meus pais, Adriane Cardozo e José Moraes e aos meus avôs Maria e Sinésio e ao meu irmão Guilherme por todo apoio e amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por todas as oportunidades e por guiar meus passos na direção correta.

Aos meus pais, Adriane Cardozo e José Moraes, por possibilitar realizar meu sonho dentro das dificuldades e me apoiar nos momentos difíceis e de dúvidas.

Aos meus avós Maria e Sinésio por sempre acreditarem em mim e ajudar na realização do meu sonho.

Ao grupo “Só os ruins” (Anna Lara, Álison, Bianca, Lucas, Larissa, Samuel e Vanessa) pela amizade incrível nesses anos, pelas horas de estudo, pelas festas sensacionais e principalmente por me aguentar.

A turma de 2014 com todos os agregados, por possibilitar conhecer pessoas maravilhosas, no qual espero levar a amizade para vida toda.

Aos professores Marcia Flores da Silva Ferreira, Liana Hilda Golin Mengarda e Adésio Ferreira pela orientação, pelo conhecimento passado e apoio | nessa etapa tão difícil.

As amigas Anna Lara e Amanda, por todo apoio e ajuda nos momentos difíceis, pelas inúmeras festas que resultaram em histórias maravilhosas, pelas noites das meninas e principalmente pelos conselhos.

A Universidade Federal do Espírito Santo por proporcionar uma instrução técnica de qualidade, a FAPES, CAPES, CNPq e VALE, pelo auxílio financeiro possibilitando a execução do presente trabalho.

RESUMO

Estudos de diversidade genética permitem identificar indivíduos representativos da variabilidade genética existente nas populações para fins de melhoramento genético, e também caracterizar a situação de conservação da área em estudo. Objetivou-se, com este trabalho, estimar a diversidade genética de plantas de *Euterpe edulis* divergentes morfológicamente, que possam ser utilizadas como progenitores, e as suas progênies. Foram avaliadas 21 matrizes, sendo 13 matrizes em uma área manejada para a exploração sustentável dos frutos, localizada em Rio Novo do Sul, população na qual se encontram-se as matrizes com alto desempenho morfológico, com destaque para RNS_120, RNS_154, RNS_76 e RNS_75; e 8 matrizes em populações naturais em áreas protegidas, sendo cinco matrizes em Pinheiros, e três matrizes em Linhares. Também foram avaliadas cerca de 10 progênies de cada uma das 21 famílias, totalizando 208 indivíduos. A genotipagem foi realizada pelo uso de oito marcadores microssatélites (SSR). Foram realizadas análises descritivas da diversidade, obtendo-se as heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E) e o índice de endogamia (f). Foi realizada uma análise de variância molecular (AMOVA) para determinar a diversidade genética entre as matrizes e as progênies. As matrizes da área de cultivo manejada de Rio Novo do Sul apresentaram maiores H_O e H_E , e menor f , indicando maior diversidade. Menores H_O e H_E e maior f foram observados para as matrizes de Pinheiros, indicando menor diversidade e endogamia. A análise da variância entre as populações de matrizes revelou maior variação genética intrapopulacional que interpopulacional. Contudo, considerando as progênies, observou-se aumento da proporção atribuída à variação interpopulacional, ou seja, “entre as famílias de progênies”. Logo, as progênies (21 famílias) apresentam maior diferenciação entre si do que os progenitores (21 populações de matrizes). O teste de paternidade tem como objetivo de identificar o pai mais provável dentro de conjunto de candidatos, com isso a matriz que obteve um maior número de progênies com candidatos à pap foi M12, com uma porcentagem de 19 % e as matrizes que obtiveram menores números de progênies foram M7 e M14, com porcentagem menor que 0%. Os resultados mostram que, ao contrário do esperado, as populações naturais de *E. edulis*, localizadas em áreas

protegidas no município de Linhares e, especialmente, em Pinheiros, apresentam menor diversidade genética. Já a área manejada, além de indivíduos com alto desempenho morfológico, apresenta indivíduos com boa estimativa de diversidade para as matrizes e suas progênes, indicando potencial para a conservação e uso sustentável do recurso genético nesta área. As matrizes indicadas para cruzamento, com possibilidade de gerar descendentes com maior desempenho e alta diversidade, são RNS_154 e RNS_76.

Palavras chave: palmeira juçara, SSR, heterozigosidade, melhoramento de plantas, manejo sustentável.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo geral	3
1.2.2 Objetivos específicos	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. METODOLOGIA	6
3.1. Material biológico e área de estudo	6
3.2. Extração e amplificação do DNA	7
3.3 Análises de diversidade genética	9
3.4 Análises de paternidade	9
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
5. CONCLUSÕES	18
6. REFERÊNCIAS	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- identificação das matrizes e respectivas famílias de meio irmãos	16
Tabela 2 - Estimativas dos índices de diversidade genética com base em oito loci microssatélites para entre as populações de RNS, RBCV e RNV.	20
Tabela 3 - Estimativas dos índices de diversidade genética com base em oito loci microssatélites para as 208 progênies das 21 famílias de meios irmãos.	21.
Tabela 4 - Análise de variância molecular entre e dentro das três populações de matrizes e entre e dentro das 21 famílias de <i>Euterpe edulis</i> .	22.
Tabela 5 - Análise de teste de paternidade para 208 progênies das 21 famílias de <i>Euterpe edulis</i> .	26.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização geográfica das 21 matrizes de *E. edulis* abrangendo a área manejada no município de Rio Novo do Sul, e as duas populações naturais nos municípios de Linhares e Pinheiros, ES. 17.

Figura 2 - Géis representativos dos testes de amplificação utilizando primers de microssatélites em *Euterpe edulis* 18.

Figura 3 - Análise de coordenadas principais com base nas distâncias genéticas entre as 21 matrizes e entre as 208 progênies. Porcentagem da variação representada pelos dois eixos: **A** - entre as matrizes: eixo 1 = 27,05; eixo 2 = 17,47, soma = 44,97%; **B** - entre as progênies: eixo 1 = 12,81, eixo 2 = 9,05, soma = 21.86%. Matrizes e progênies de Rio Novo do Sul são representadas na cor verde. Matrizes e progênies de Linhares são representadas na cor vermelha. Matrizes e progênies de Pinheiros são representadas na cor azul 24.

Figura 4 - Dissimilaridade genética média entre os indivíduos das 21 famílias de *E. edulis*. As barras representam o erro padrão da média. 25

1. INTRODUÇÃO

Euterpe edulis (palmeira juçara) é uma espécie florestal da Mata Atlântica de grande importância agroecológica, sendo considerada uma espécie-chave da Mata Atlântica, pois seus frutos amadurecem em uma época de escassez geral de recursos na floresta, e, portanto, são fonte de alimento para um grande número de aves e mamíferos (REIS; KAGEYAMA, 2000, GENINI et al., 2009). Contrastante à sua importância ecológica, as populações vêm sofrendo diminuição no seu tamanho devido à fragmentação das florestas, além de ter a sua regeneração natural reduzida drasticamente pela intensa exploração do palmito que produz (LIMA et al., 2008).

Esta palmeira vem recebendo maior atenção quanto ao seu potencial de produção de frutos para a obtenção de polpa, a qual é muito similar ao açaí (COSTA et al., 2006).

A produção de polpa desta espécie, tem se destacado por ser uma alternativa de uso sustentável que apresenta elevado potencial para estimular a implantação de cultivos agroecológicos, monocultivo, consórcio, os quais podem contribuir com a manutenção da variabilidade genética da espécie, uma vez que esta encontra-se ameaçada de extinção.

A espécie é convencionalmente alógama, que apresenta protandria acentuada (MANTOVANI; MORELLATO, 2000) e taxas de fecundação cruzada próximas de 1,0 (REIS, 1996; CONTE et al., 2008; GAIOTTO et al., 2003). Deste modo, em famílias naturais espera-se encontrar alta variabilidade, constituindo uma representação da diversidade genética existente nas populações nas quais as plantas matrizes estão inseridas. No entanto, a fragmentação florestal pode ocasionar a redução das populações naturais, da diversidade genética, bem como propiciar o cruzamento entre indivíduos aparentados, limitando a variabilidade das progênes de *E. edulis* (CONTE et al., 2008; GAIOTTO et al., 2003), e restringindo a base genética disponível para o melhoramento da espécie.

Diferentes medidas biométricas têm sido utilizadas para estudo de diversidade genética, visando esclarecer os efeitos da deriva genética e verificar sua distribuição dentro e fora das populações.

O conhecimento da variabilidade genética entre matrizes e entre e dentro de suas progênes permite identificar as matrizes representativas da variabilidade genética existente nas populações e também caracterizar a situação de conservação da área em estudo com base na variabilidade genética entre os indivíduos que ali se encontram (OLIVEIRA et al., 2004, 2007).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a diversidade genética das plantas mais divergentes a estrutura genética e o sistema de cruzamento em famílias de meios irmãos de um cultivo manejado e não manejada de *Euterpe edulis*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a diversidade genética entre as famílias de meios irmãos e dentro de cada família;
- Determinar se existe estrutura genética entre as famílias de meios irmãos *E. edulis* M.;
- Estimar o fluxo gênico indireto;
- Estimar o sistema de cruzamento predominante entre as famílias de meios irmãos;

2. REVISÃO DE LITERATURA

Conhecido popularmente como juçara, jiçara, palmitreiro ou palmito doce, o *Euterpe edulis* apresenta distribuição generalizada ao longo de todo o bioma Mata Atlântica (VIEIRA et al., 2018; SCHULZ et al., 2016) e elevada importância na composição florística de matas ciliares e na conservação de mata secundária (BORÉM e OLIVEIRAFILHO, 2002).

O *Euterpe edulis* é considerado uma espécie chave do bioma, pois seus frutos servem de alimento para diversos mamíferos e aves, sendo estes importantes dispersores de sementes, auxiliando tanto na manutenção da diversidade genética das populações quanto para colonização de novas áreas (REIS e KAGEYAMA, 2000).

Sofrendo com a forte pressão das atividades humanas sobre seus indivíduos, sendo os mesmos abatidos para obtenção do palmito, o *Euterpe edulis* atualmente é uma espécie em risco de extinção (BRASIL, 2008; LIMA, 2008; GANEM, 2010, BARROSO; REIS e HANAZAKI, 2010; BATAGIN-PIOTTO et al. 2012), presente em listas de espécies ameaçadas de extinção no Brasil e no Espírito Santo (BRASIL, 2008; BIODIVERSITAS, 2013).

A fragmentação do bioma e a redução do número de indivíduos em suas populações ocasionam alterações no fluxo genético das populações, podendo aumentar a taxa de endogamia e resultar em deriva genética (**CITAR**). Assim, espera-se uma redução da variabilidade genética e resultante do processo da endogamia, um aumento na probabilidade da ocorrência dos efeitos deletérios nas progênes, acontecendo principalmente nas espécies que tem fecundação predominantemente cruzada (CHARLESWORTH e CHARLESWORTH, 1987; ELLSTRAND, 1992; ELLSTRAND e ELLAN, 1993).

Microssatélites são unidades de repetição de pares de bases do DNA, no qual são unidades de 1 a 6 nucleotídeos repetidas em tandem, distribuídas amplamente pelo genoma de eucariotos (TAUTZ & RENZ, 1984; TAUTZ, 1989).

Para a caracterização da diversidade, existem vários marcadores moleculares disponíveis, porém é que usa a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), o

mais recomendado, devido poder se obter cópias de uma parte do material genético em quantidade suficiente.

Os marcadores microssatélites vêm desempenhando uma função enorme para caracterização da diversidade genética (MILACH, 1998), no Brasil se utiliza nas coleções de germoplasmas (FALEIRO et al., 2001; ALVES et al., 2003; CONTE et al., 2006).

O conceito de diversidade gênica refere-se ao nível de heterozigosidade máxima potencial (H_e) de uma população de cruzamentos ao acaso, obtido de suas frequências alélicas, com isso pode se obter um grande número de combinações genotípicas, aumentando variabilidade genética e potencial evolutivo da espécie (NEI, 1973 e REIS, 1996^a).

Vários fatores vêm desempenhando influência na distribuição da variabilidade genética natural, principalmente fatores como fluxo gênico, taxa de cruzamento, tamanho efetivo populacional, isso ocorre devido a dispersão de pólen e sementes (HAMRICK, 1983).

A definição de coancestria é que dois indivíduos são idênticos, quando se alcança a autocoancestria (θ_{xx}), que é igual à endogamia na descendência após autofecundações. Com isso, a coancestria média de uma população está definida como a autocoancestria e a coancestria entre todos os pares de indivíduos da população (LINDGREN et al., 1997).

3. METODOLOGIA

3.1. Material biológico e área de estudo

Foram amostradas 21 matrizes de *E. edulis*, das quais 13 matrizes estão localizadas em Rio Novo do Sul (RNS), cinco na Reserva Biológica do Córrego do Veado (RBCV), no município de Pinheiros; e três matrizes na Reserva Natural da Vale (RNV), no município de Linhares (Tabela 1, Figura 1), no estado do Espírito Santo.

Foram coletadas amostras de estipe e frutos maduros das 21 matrizes, entre os meses de abril e junho de 2016.

Tabela 1- Identificação das matrizes e respectivas famílias de meio irmão.

Matriz	Família	Indivíduos	Município
RNS_17	1	01 - n10	Rio Novo do Sul
RNS_131	2	11 -n 20	Rio Novo do Sul
RNS_143	3	21-30	Rio Novo do Sul
RNS_154	4	31-40	Rio Novo do Sul
RNS_157	5	41-50	Rio Novo do Sul
RNS_67	13	51-60	Rio Novo do Sul
RNS_75	14	61-70	Rio Novo do Sul
RNS_76	15	71-80	Rio Novo do Sul
RNS_100	16	81-90	Rio Novo do Sul
RNS_114	17	91-100	Rio Novo do Sul
RNS_120	18	101-110	Rio Novo do Sul
RNS_141	19	111-120	Rio Novo do Sul
RNS_183	20	121-130	Rio Novo do Sul
L_32	10	131-140	Linhares
L_33	11	141-150	Linhares
L_39	12	151-159	Linhares
P_1	6	161-170	Pinheiros
P_2	7	171-180	Pinheiros
P_3	8	181-190	Pinheiros
P_10	9	191-200	Pinheiros
P_21	21	201-208	Pinheiros

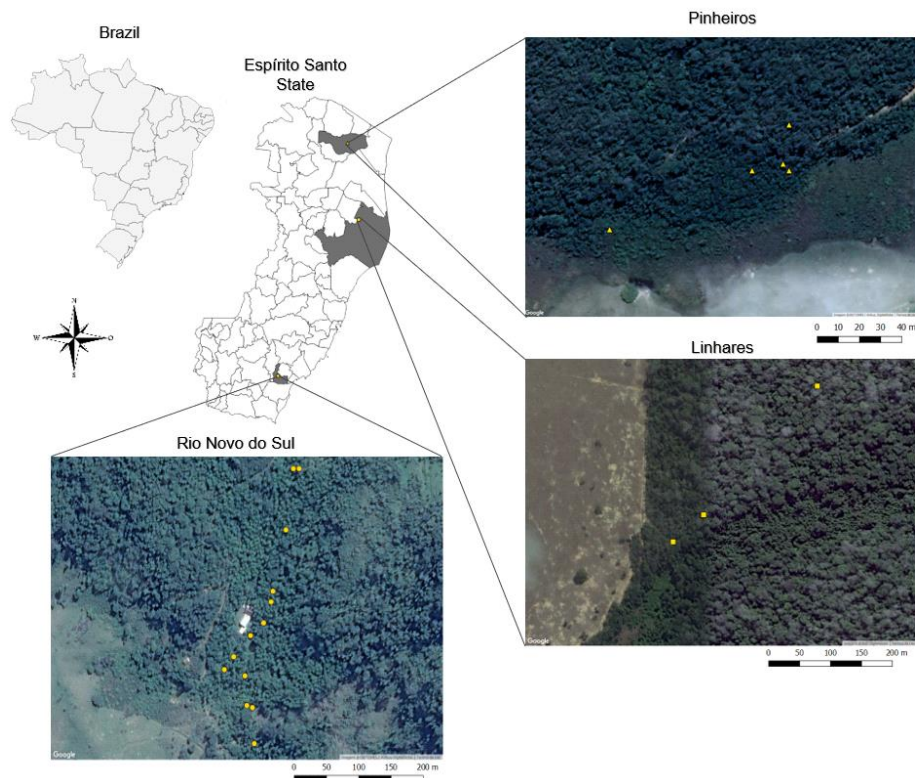


Figura 1 - Localização geográfica das 21 matrizes de *E. edulis* abrangendo os municípios de Rio Novo do Sul, Linhares e Pinheiros, ES.

Os frutos das 21 matrizes foram levados para casa de vegetação, colocados em vasos devidamente identificados para germinação. Após a emergência das plântulas, dez indivíduos de cada família de meio irmão foram transplantados para tubetes individuais. De cada plântula foi coletada uma amostra de folha, as quais foram liofilizadas, fornecendo material biológico para a extração de DNA genômico.

3.2. Extração e amplificação do DNA

A genotipagem foi realizada no Laboratório de Genética e Melhoramento Vegetal, UFES – CCAE. O DNA genômico das matrizes foi extraído de fragmentos de estipe de *E. edulis*; o DNA das progênies foi extraído de folhas das plântulas. A extração foi baseada no método CTAB (Brometo de cetil-trimetil amônio) (DOYLE; DOYLE, 1990) com modificações. As concentrações de DNA das amostras foram estimadas com o uso de espectrofotômetro (*nanoDrop2000*) e a integridade do DNA foi verificada por gel de agarose 0,8%.

As ampliações dos microssatélites foram realizadas utilizando-se oito microssatélites desenvolvidos para a espécie (GAIOTTO et al., 2001). A reação de PCR foi de um volume de 13 μ L composta por: 30 ng de DNA genômico; 1X de tampão 10 (Phoneutria); 0,15 μ M de cada *primer* (*forward* e *reverse*); 1,5 mM MgCl₂; 0,25 mM dNTPs; e 1 U de Taq DNA polimerase. O programa utilizado foi: 94°C por quatro minutos; 30 ciclos compostos por 94°C por um minuto e meio; temperatura de anelamento do *primer* (GAIOTTO et al., 2001) por um minuto; 72°C por um minuto; uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em géis de poliacrilamida 10% e tampão TBE 1x a 100 volts e corados com GelRed (1,33 x). Em seguida foram fotografados por sistema de fotodocumentação (Figura 3)

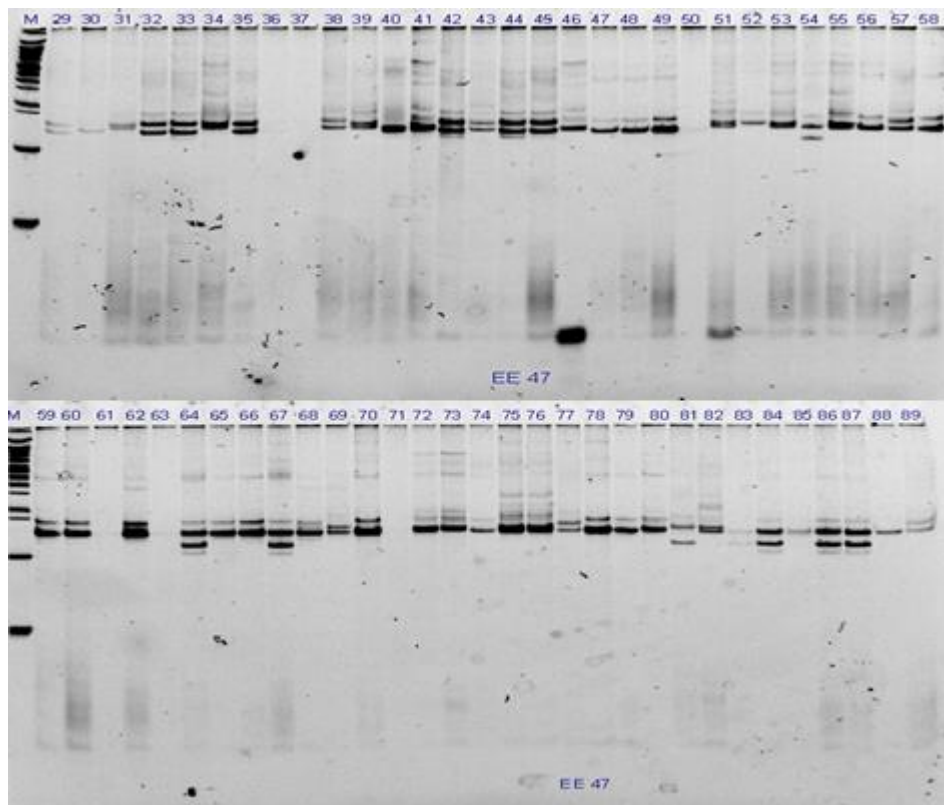


Figura 2 - Géis representativos dos testes de amplificação utilizando primers de microssatélites em *Euterpe edulis*.

3.3 Análises de diversidade genética

As análises de diversidade genética foram realizadas entre as populações de RNS, RNV e RBCV, dentro de cada população e também sendo determinados os índices de diversidade entre e dentro de cada uma das 21 famílias de meio irmãos.

Foi realizada a análise descritiva da diversidade obtendo-se: número de alelos (A), heterozigosidade esperada (H_E), heterozigosidade observada (H_o) e coeficiente de endogamia (f), pelo programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2001).

A diferenciação intra e interpopulacional foram estimadas por análises de variância molecular (AMOVA), com dois níveis hierárquicos, utilizando o programa Arlequin (CARVALHO, 2015).

As relações genéticas entre os indivíduos foram avaliadas por meio de matriz de dissimilaridade, construída com uso do complemento do índice de similaridade, pelo programa Genes (CRUZ, 2013), com a qual foi realizada a análise de Coordenadas Principais (PCoA) utilizando o programa DARWin 6.0.14, sendo plotados os dois primeiros eixos.

Foi calculada a média das distâncias genéticas entre os indivíduos de cada uma das 21 famílias, sendo estes valores plotados em gráfico de barras com seu respectivo erro padrão da média.

3.4 Análises de paternidade

Foi empregado o programa CERVUS 2.0 (MARSHALL, 2007), para a realização do teste de paternidade.

O programa calcula para cada um dos *loci* uma razão de máxima verossimilhança (*likelihood ratio*, *LRT*) entre duas probabilidades condicionais.

A simulação baseia-se nas frequências alélicas observadas na população para simular dados genéticos e conduzir testes de paternidade para um grande número de progênes, com o objetivo de gerar distribuições do Δ , é definido como diferença do *LOD* entre pai mais provável e segundo pai mais provável. As simulações levam em conta o número de candidatos a pai (estimados a partir de dados de campo), a proporção amostrada de candidatos a pai (estimados a partir de dados de campo), a proporção de *loci que* foram genotipados nos indivíduos

(calculados a partir do conjunto de dados genéticos) e a frequência de erros de genotipagem (Slate,2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 21 matrizes estudadas, cabe destacar aquelas com alto desempenho morfológico: RNS_120 (família 18), RNS_154 (família 04), RNS_76 (família 15) e RNS_75 (família 14), como possíveis progenitores, uma vez que de acordo com estudo de pré-melhoramento (CANAL, 2016), estes são indivíduos superiores para as características de interesse ao melhoramento. Os índices de seleção permitem identificar genótipos de interesse do melhorista de maneira rápida e eficiente (CRUZ et al., 2006).

Com relação as análises de diversidade, os marcadores microssatélites utilizados na análise das matrizes e dos indivíduos das 21 famílias de *Euterpe edulis* foram polimórficos e de fácil identificação nos géis.

As análises de diversidade entre as populações (RNS, RBCV e RNV), permitiram observar que heterozigidade esperada (H_E) variou entre 0,41 (RBCV) e 0,54 (RNS), e os valores da heterozigidade observada (H_o) variaram entre 0,35 (RBCV), e 0,59 (RNS). O valor do coeficiente de endogamia foi menor para as matrizes de RNS ($f = 0,0847$), e maior para as matrizes de RBCV ($f = 0,15$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Estimativas dos índices de diversidade genética com base em oito loci microssatélites para entre as populações de RNS, RBCV e RNV.

Populações das Matrizes	N	A	Ap	H_E	H_o	F
Rio Novo do Sul (RNS)	13.00	3.00	3.00	0.54	0.59	0.08
Pinheiros (RBCV)	5.00	2.13	2.29	0.41	0.36	-0,139
Linhares (RNV)	3.00	2.00	2.14	0.48	0.50	0.04
Média das matrizes	-	2.38	2.48	0.48	0.48	0.097

N: tamanho da amostra; A: número médio de alelos por locus; Ap: proporção de loci polimórficos; H_E : heterozigidade média esperada; H_o : heterozigidade média observada; f: coeficiente de endogamia ou índice de fixação de W.

As matrizes de RNCV tiveram índice de endogamia mais negativo, apresentando, portanto, indivíduos mais endogâmicos. As matrizes deste local também foram aquelas que tiveram menor média de H_E , demonstrando, assim, menor diversidade em relação as matrizes de Linhares e de Rio Novo do Sul. Para uma adaptação local melhor e colonização de novos ambientes é favorável que espécie possa ter um maior numero de recombinações genotípicas, pois assim irá ter alta taxa de heterozigose (SEBBENN et al., 1998).

As matrizes de RNS foram as que obtiveram maior média de H_o em relação às matrizes de RNV e RNCV, indicando que os indivíduos destas áreas apresentam maior diversidade genética.

Entre as 174 progênies verificaram-se H_E entre 0,17 e 0,45, com média de 0,45. Os valores de H_o variaram entre 0,17 a 0,70, apresentando média de 0,41. O coeficiente de endogamia nas famílias variou de $f = -0,72$ a $-0,01$, apresentando média de $-0,44$ (Tabela 2). Os valores de coeficiente de endogamia para as progênies ($-0,44$ em média) foram mais negativos que para as matrizes ($-0,01$ em média).

Assim como para as matrizes, as famílias de RNS tiveram as maiores médias de H_E (0,32) e de H_o (0,44). As famílias de RNV obtiveram média de H_E e H_o de 0,32 e 0,43, respectivamente, e as famílias Pinheiros tiveram as menores médias dos índices de diversidade: $H_E = 0,22$ e $H_o = 0,32$.

Tabela 3 - Estimativas dos índices de diversidade genética com base em oito loci microssatélites para as 208 progênies das 21 famílias de meio irmãos.

Local de coleta	Família	N	A	Ap	H_E	H_o	F
Rio Novo do Sul (RNS)	1	7	2.13	2.29	0.38	0.62	-0.72
	2	8	1.88	2.75	0.31	0.47	-0.34
	3	8	1.75	2.00	0.33	0.54	-0.39
	4	8	1.63	2.00	0.25	0.36	-0.305
	5	9	1.88	2.00	0.36	0.56	-0.36
	13	8	2.13	2.29	0.41	0.42	-0.024
	14	8	1.75	2.00	0.28	0.36	-0.27
	15	8	1.88	2.17	0.32	0.37	-0.19
	16	8	1.75	2.00	0.24	0.36	-0.55
	17	9	2.13	2.13	0.40	0.56	-0.43
	18	8	1.75	2.00	0.24	0.29	-0.21
	19	8	2.13	2.13	0.45	0.70	-0.62
	20	9	1.75	2.00	0.17	0.17	-0.01
Média das progênies de RNS			1.89	2.14	0.32	0.44	-0.42
Pinheiros (RBCV)	6	9	1.63	2.00	0.21	0.33	-0.66
	7	8	1.63	2.00	0.25	0.38	-0.56
	8	9	1.75	2.00	0.23	0.29	-0.27
	9	9	1.75	2.00	0.23	0.33	-0.47
	21	9	1.75	3.00	0.19	0.28	-0.54
Progênies de Pinheiros de RBCV			1.70	2.20	0.22	0.32	-0.50
Linhares	10	8	1.75	2.00	0.30	0.43	-0.45
	11	8	1.88	2.17	0.35	0.49	-0.46
	12	8	1.88	2.17	0.31	0.37	-0.23
Progênies de Linhares			1.84	2.11	0.32	0.43	-0.38
Média de todas as progênies			1.83	2.17	0.29	0.41	-0.44

N: tamanho da amostra; *A*: número médio de alelos por locus; *A_p*: proporção de loci polimórficos; *H_E*: heterozigosidade média esperada; *H_O*: heterozigosidade média observada; *f*: coeficiente de endogamia ou índice de fixação de *W*.

Curiosamente, as famílias de Pinheiros, as quais apresentaram menor diversidade, apresentaram coeficientes de endogamia mais negativos (-0,50), o que indicaria indivíduos menos endogâmicos nas progênes. Contudo, tais resultados podem ser resultado do efeito de Wahlund, que afirma que um valor mais negativo de *f*, maior quantidade de indivíduos heterozigotos do que o esperado, podendo acontecer para as primeiras gerações após duas populações anteriormente isoladas se tornarem somente uma (McMANUS et al., 2011). Isso seria possível também se, considerando uma área de preservação, ali tivessem sido plantadas mudas de *E. edulis* trazidas de outras áreas.

Contudo, o efeito de Wahlund também explica que a seleção contra homozigotos durante o recrutamento poderia afetar a resposta do *F*. A seleção contra homozigotos nos estádios iniciais da vida poderia dar a impressão de heterozigosidade maior e, por consequência, coeficientes de endogamia menores (REMINGTON; O'MALLEY 2000; HUFFORD; HAMRICK 2003).

A análise da variância molecular (AMOVA) entre as populações de matrizes revelou 90% da variabilidade genética dentro das populações (intrapopulacional) e apenas 10% entre as populações de matrizes (interpopulacional) (Tabela 4). Tal resultado corrobora as afirmações de autores como Kageyama et al. (2003) de que em plantas tropicais, a distribuição da variabilidade é maior dentro das populações que entre populações. Conte et al. (2008) afirmam que as espécies tropicais como *E. edulis*, com amplos intervalos geográficos, sistemas de cruzamentos transversais e altas taxas de fluxo de genes, têm mais variabilidade genética dentro das populações e, conseqüentemente, baixa divergência entre as populações.

A análise da variância entre as 21 famílias também revelou maior variabilidade genética intrapopulacional (57%) que interpopulacional (43%) (Tabela 4). Contudo, considerando as famílias, observou-se uma maior proporção da variação atribuída “entre”, o que demonstra que as 21 famílias apresentam maior diferenciação entre si do que populações de matrizes. O valor de diferenciação genética entre as populações de matrizes (*F_{ST}*) foi de 0,100, e entre as famílias foi 0,433, ambos significativos ($p < 0,001$).

Tabela 4 - Análise de variância molecular entre e dentro das três populações de matrizes e entre e dentro das 21 famílias de *Euterpe edulis*.

	Fonte de variação	Soma de quadrados	Variância	Porcentagem
Populações de matrizes	Entre	09.126	0.2241	10.001
	Dentro	77.516	2.0166	89.998
	Total	86.642	2.2407	
	F_{ST}	0.1000		
Famílias	Entre	325,87	0.9087	43.295
	Dentro	389.94	1.1902	56.705
	Total	715.81	2.0989	
	F_{ST}	0.4330		

A análise de coordenadas principais (PCoA) com base nas distâncias genéticas entre as 21 matrizes (Figura 2) indicou que as três populações de matrizes apresentam indivíduos geneticamente distantes entre si, e menos diversos dentro de cada população. Ainda, com base nesta análise é possível identificar as matrizes mais divergentes entre si, como, por exemplo, a matriz 12 (L_39) da RNV e a RNS_154 de RNS (Figura 2 A). As matrizes 4 e 15 são divergentes entre si e as 14 e 18 menos divergentes entre si. O posicionamento na figura 2 evidencia isso, sendo 14 e 18 estarem no mesmo quadrante. Uma das explicações das matrizes 4 e 15 serem tão divergentes seria polinização. Para ter um sucesso no cruzamento se recomenda matrizes de Rio Novo do Sul, as matrizes 4x19, 4x2 são bastante divergentes entre si.

Quanto menor a distância genética, mais semelhantes geneticamente são os indivíduos. Logo, os cruzamentos entre estes indivíduos podem ser inviáveis para poder gerar variabilidade genética maior, devido ao menor potencial de heterose em alelos favoráveis. Loveless e Hamrick (1984) afirmaram que a diferenciação entre as populações tende a ser reduzida quando as espécies apresentam fertilização cruzada e fluxo de pólen.

Na PCoA entre as 208 progênies observaram-se distâncias maiores do que as distâncias observadas entre as matrizes (Figura 3B), confirmando o resultado observado na AMOVA.

As famílias selecionadas seriam que fossem mais divergentes, ou seja, que estão lados opostos do gráfico (Figura 3B), pois seriam indivíduos mais diferentes geneticamente, sendo assim favorável para melhoramento genético.

Os indivíduos das famílias de RNS (representados na cor verde) apresentaram-se, em sua grande maioria, nos quadrantes inferiores. Já as maiorias dos indivíduos das populações naturais de RBCV, representados em azul, e de RNV, representados em vermelho, estão no quadrante superior esquerdo, e mais próximos entre si (Figura 3B).

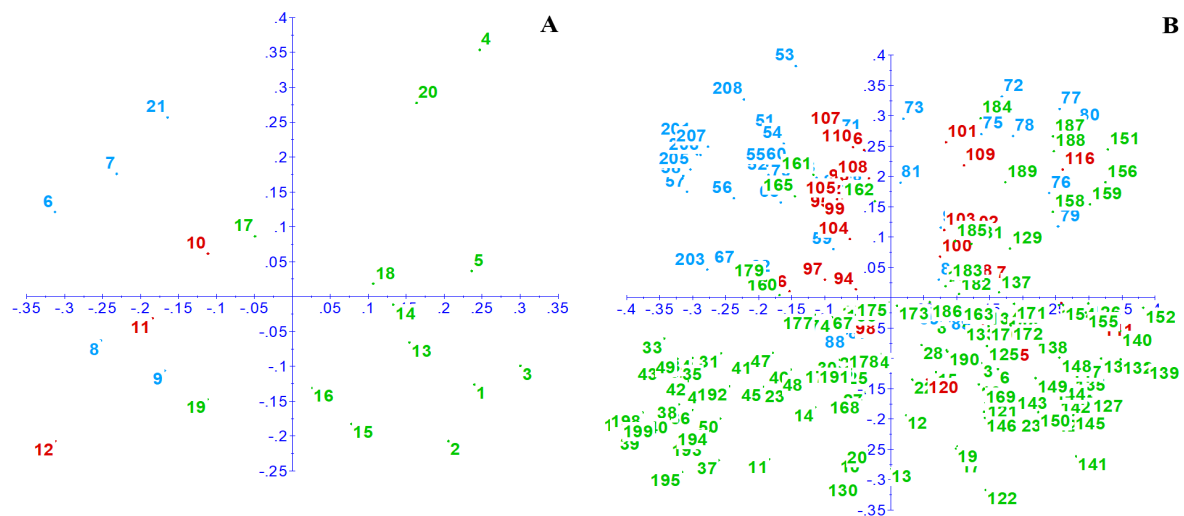


Figura 3 - Análise de coordenadas principais com base nas distâncias genéticas entre as 21 matrizes e entre as 208 progênies. Porcentagem da variação representada pelos dois eixos: **A** - entre as matrizes: eixo 1 = 27,05; eixo 2 = 17,47, soma = 44,97%; **B** - entre as progênies: eixo 1 = 12,81, eixo 2 = 9,05, soma = 21,86%. Matrizes e progênies de Rio Novo do Sul são representadas na cor verde. Matrizes e progênies de Linhares são representadas na cor vermelha. Matrizes e progênies de Pinheiros são representadas na cor azul.

A família 8 (população natural da RBCV) foi que teve a menor média de dissimilaridade genética entre as progênies (Figura 3), ou seja, possui indivíduos mais homogêneos geneticamente entre si. Já a família 13 (área de cultivo de RNS) foi que teve uma maior dissimilaridade entre as progênies. De modo geral, as famílias desta área manejada apresentam dissimilaridade genética de média ($\geq 0,25$) à alta ($\geq 0,50$), sendo menor que 0,25 apenas para as famílias 4 e 5 (Falar de onde surgiu essa classificações para determinar quanto dissimilaridade alta, média ou baixa). As três famílias de Linhares apresentam dissimilaridade genética média. Já

as cinco famílias de Pinheiros apresentam dissimilaridade de média ($\geq 0,25$) à baixa ($\leq 0,25$).

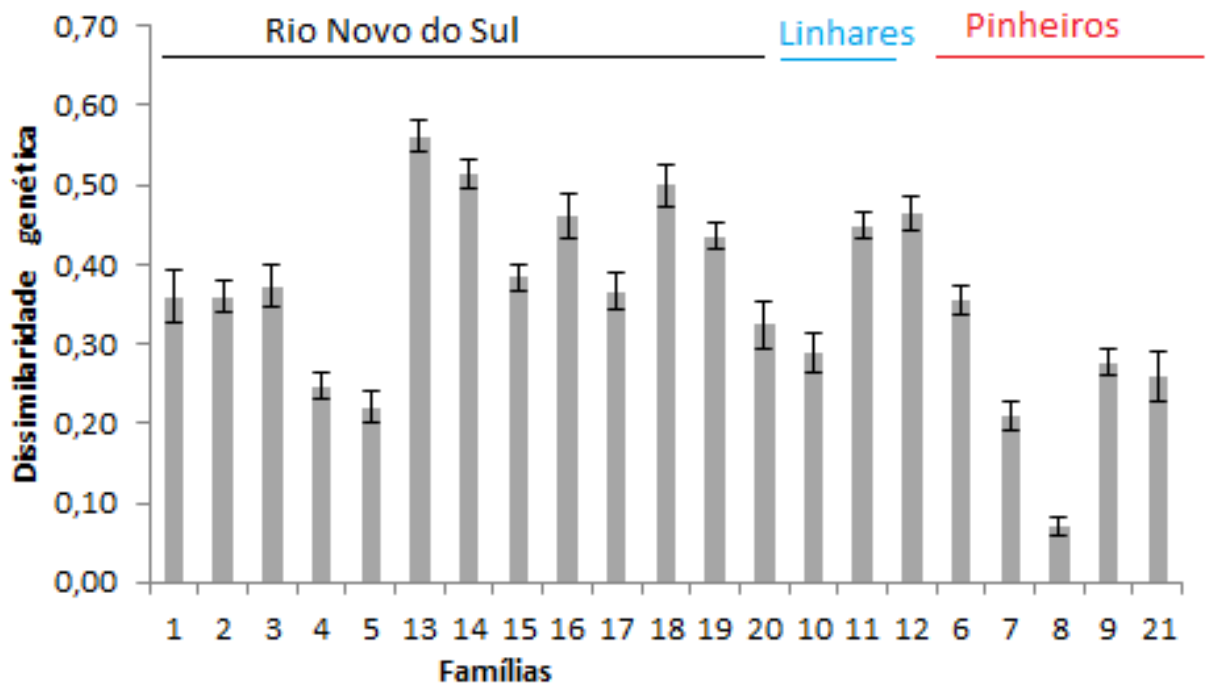


Figura 4 - Dissimilaridade genética média entre os indivíduos das 21 famílias de *E. edulis*. As barras representam o erro padrão da média.

Esses resultados coincidem com dados referentes a as análises de diversidade, (Tabela 2 e Tabela 3), aonde se verificaram maiores heterozigosidade (H_O e H_E) para a área de Rio Novo do Sul, e menor diversidade tanto para as matrizes quanto para as famílias da população natural de Pinheiros.

O teste de paternidade, revelou que as progênes 98,109,115 e 132 obtiveram dois candidatos a pai, o resto das progênes apenas uma cada. A matriz que obteve um maior número de progênes com candidatos á pai foi M12, com uma porcentagem de 19 % e as matrizes que obtiveram menores números de progênes foram M7 e M14, com porcentagem menor que 0%. A progênie de número de 10 não obteve nenhum candidato a pai.

A matriz que obteve um maior número de progênes está localizada em RBCV em uma população natural, podendo ser resultado de uma endogamia, como identificado em outras análises, a população de RNV apresenta uma menor

diversidade genética, assim havendo a possibilidade de uma depressão endogâmica.

Tabela 5 - Análise de teste de paternidade para 208 progênies das 21 famílias de *Euterpe edulis*.

Candidato a pai	Número de progênies	Porcentagem de progênies
M12	40	19%
M20	27	13%
M18	22	10%
M15	16	8%
M9	15	7%
M1	11	5%
M5	10	5%
M6	10	5%
M10	10	5%
M4	9	4%
M21	8	4%
M3	6	3%
M19	6	3%
M2	4	2%
M11	4	2%
M16	5	2%
M8	2	1%
M13	2	1%
M17	3	1%
M7	1	0%
M14	1	0%

5. CONCLUSÕES

Os resultados mostram que, ao contrário do esperado, as populações naturais de *E. edulis*, localizadas em áreas protegidas no município de Linhares e, especialmente, em Pinheiros, apresentam menor diversidade genética. Sugere-se a implementação de estratégias *in situ*, introduzindo indivíduos alóctones, além da inclusão de corredores ecológicos. As matrizes 2 (RNS_131), 3 (RNS_143), 4 (RNS_154), e 21(P_21), sendo as matrizes indicadas para fornecer sementes e mudas para ser introduzidas em Linhares. Já para Pinheiros, sugere-se introduzir mudas das matrizes 2 (RNS_131), 3 (RNS_143), 4 (RNS_154) e 12 (L_39).

Para a área de Rio Novo do Sul, a matriz 4 (RNS_154) seria indicada como progenitora para fornecer sementes e mudas, bem como para cruzamentos visando o melhoramento genético.

6. REFERÊNCIAS

- ALDRICH, R.P.; HAMRICK, J.L.; CHAVARRIAGA, P.; KOCHERT, G. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. **Molecular ecology**, v. 7, p. 933-944, 1998.
- ALMEIDA, C.M.A de.; LIMA, S.E.N de.; LIMA, G.S de A.; BRITO, J.Z de.; DONATO, V.M.T.S.; SILVA, M.V da. Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar.
- ALVES, R.M.; ARTERO, A.S.; SEBBENN, A.M.; FIGUEIRA, A. Mating system in a natural population of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum., by microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.26, p.373-379, 2003.
- BARROSO, R.M; REIS, A.; HANAZAKI, N. Etnoecologia e etnobotânica da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius) em comunidades quilombolas do Vale do Ribeira, São Paulo. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte- MG, v.24, n.2, p.518-528, 2010
- BATAGIN-PIOTTO, K. D.; ALMEIDA, C. V.; PIOTTO, F.A.; ALMEIDA, M. Anatomical analysis of peach palm (*Bactris gasipaes*) leaves cultivated in vitro, ex vitro and in vivo. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 71-78, 2012.
- BICALHO, K.C.; OLIVEIRA, L.E.M de; SANTOS, J.B dos; MESQUITA, A.C.; MENDONÇA, E.G. Similaridade genética entre clones de seringueira (*Hevea brasiliensis*), por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.5, p.1510-1515, set./out., 2008
- BIODIVERSITA. Disponível em: <http://www.biodiversitas.org.br/floraBr/> Acessado em: 04 de abril de 2016.
- 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.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa N. 6, de 26 de setembro de 2008. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção, 2008

CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*, Davis, v. 18, p. 237-268, 1987.

CONTE, R. **Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites.** 2004. 124 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

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

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

COSTA, E. A. D., CORBELLINI, L. M., REIS, C. S., SANTOS, A. S., VITOR, J., CHERAULTI, V. J. Produção de polpa e sementes dos frutos de *Euterpe edulis* Mart. – uma alternativa de geração de renda e uso sustentável da mata atlântica. *Biológico*, São Paulo, v. 68, suplemento, p. 663-666, 2006.

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

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.S.C. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 2ed. Viçosa: UFV, 2006, v.2. 586p

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

ELLSTRAND, N.; ELAM, D.R. **Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation.** *Annual review on ecological systems*, v.24, p. 217-242, 1993.

FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; YAMADA, M.M.; PIRES, J.L.; BAHIA, R.C.S.; SANTOS, R.C.; GOMES, L.M.C.; ARAÚJO, I.S.; FALEIRO, A.S.G.; GRAMACHO, K.P.; MELO, G.R.P.; MONTEIRO, W.R.; VALE, R.R. Caracterização de variedades clonais de *Theobromacacao* L com base em marcadores RAPD, AFLP e microssatélites. **Agrotropica, Salvador**, v.13, p.79-86, 2001.

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

GAIOTTO, F.A.; GRATTAPAGLIA, D.; VENCOVSKY, R. Geneticstructure, mating system, andlong-distance gene flow in heartofpalm (*Euterpe edulis* Mart.). **JournalofHeredity**, Carey, v.94, p.399-406, 2003.

Galetti, M. e Fernandez, J. C. 1998. Palm heartharvesting in theBrazilianAtlantic Forest: changes in industrystructureandtheillegal trade. **JournalofAppliedEcology** 35(2): 294– 301.

GENINI, J.; GALETTI, M.; MORELLATO, L. P. C. Fruitingphenologyofpalmsandtrees in anAtlanticrainforestland-bridge island. **Flora**, Holzwiesenstr, v. 204, n. 2, p. 131– 145, 2009.

GOUDET, J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computerprogramtocalculate F-statistics. **JournalofHeredity** 86:485-486.

GRATTAPAGLIA, D. Aplicações operacionais de marcadores moleculares. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotechnologia florestal**. Viçosa, MG: UFV, 2007. p.175-200

HAMRICK, J.L. The distributionofgeneticvariationwithinandamong natural planta populations. In: SCHONEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBRYDE, B.; THOMAS, W.L. (Ed.). **Geneticandconservation**. Menlo Park, The Benjamin/Cummings, p. 335-480, 1983.

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

KRAIC, J.; GREGOVÁ, E.; JOMOVÁ, K.; IIUDCOVICOVÁ, M. Microsatellitemarkersdiscriminatingaccessionswithincollectionsofplantgeneticresources. **Cellular& Molecular BiologyLetters, Wroclaw**, v.7, p.745-751, 2002.

LEWIS, P. O.; E ZAYKIN, D. **GDA** – Genetic Data Analysis: Computer program for theanalysisofallelic data. Version 1.0 (d16c). Freeprogramdistributedbytheauthors over the internet from<<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>>. Acesso em :31 abril.2017

LIMA, L. S. H.; FRANCO, E. T. H.; SCHUMACHER, M. V. Crescimento de mudas de *Euterpe edulis*Martius em resposta a diferentes doses de fósforo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 4, p. 461-470, 2008.

LINDGREN, D.; LUIGI, D. G.; JEFFERSON, P. A. Status number for measuringgeneticdiversity. **Forest Genetics**, v.4, n.2, p.69-76, 1997.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: **Plantarum**, 2002. v. 1, 385 p.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecologicaldeterminantsofgeneticstructure in plantpopulations. **Annual Review ofEcologyandSystematics**, n.15, p.65-95, 1984.

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

MARTINS.C, MAYSA.P, BRITTO.F, LUIS.E, ZAMBIAZI, DAISY,C .K, ENÉAS.R, **Análise da diversidade genética de populações de palmitero (Euterpe edulis MARTIUS) através de marcadores isoenzimáticos**. Revista Ceres [enlinea] 2009, 56

NEI, M. **Analysisof gene diversity in subdividedpopulation**. ProceedingsoftheNationalAcademyofSciences, San Diego, v. 70, n. 12, p. 3321–3323, 1973.

OLIVEIRA, M. do S.P de; FERREIRA, D.F.; SANTOS,J.B. dos..Pesquisa Divergência genética entre acessos de açazeiro fundamentada em descritores morfoagronômicos **Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.4,p.501-506, 2007.

OLIVEIRA, Visêdo Ribeiro de et al. Variabilidade genética de procedências e progênies de umbuzeiro via metodologia de modelos lineares mistos. **Revista Brasil**, Jaboticabal -, v. 26, n. 1, p.53-56, abr. 2004.

PIZO, M. A.; VIEIRA, E. M. Palm harvesting affects seed predation of *Euterpe edulis*, a threatened palm of the Brazilian Atlantic forest. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 3b, p. 669-676, 2004.

REIS, A. et AL .1996. Demografia de *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae) em uma floresta ombrófila densa montana, em Blumenau (SC). **Sellowia**, v. 45-48, p. 13-45.

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

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOSKY, R. Variabilidade genética, sistema reprodutivo. e estrutura genética espacial em *Genipa americana* L. através de marcadores isoenzimáticos. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 53, p. 15-30, 1998.

SEOANE, C. E. S. *et al.* Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Mart. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 25-43, jun. 2005.

TAUTZ, D. & RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**. 12, 4126-4138. 1984.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**. 17, 6364-6471. 1989

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annual Eugenics**. v. 15, p. 223-354, 1951. v.236, p.787-792, 1987.

YOUNG, A. G.; BOYLE, T. J. Forest fragmentation. In: Young, A. G., Boshier, D.; Boyle, T. J. Forest conservation genetics: principles and practice. Melbourne: **CSIRO Publishing**. 12

SCHULZ, M.; BORGES, G. da S. C.; GONZAGA, L. V. COSTA, A. C. O.; FETT, R. Juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.): Sustainable exploitation of a source of bioactive compounds. *Food Research International*, v. 89, p. 14-26, 2016.

VIEIRA, G. S.; MOREIRA, F. K. V.; MATSUMOTO, R. L. S.; MICHELON, M.; FILHO, F. M.; HUBINGER, M. D. Influence of nanofiltration membrane features on enrichment of jussara ethanolic extract (*Euterpe edulis*) in anthocyanins. *Journal of food engineering*, v. 226, p. 31-41, 2018.