

**WASSALI VALADARES DE SOUSA**

**ESTUDO GENÉTICO DE PALMEIRAS OLEAGINOSAS NATIVAS DO GENÊRO  
*Syagrus* UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike

Coorientadores: Guilherme da Silva Pereira  
Milene de Figueiredo

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2022**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

S725e  
2022

Sousa, Wassali Valadares de, 1997-

Estudo genético de palmeiras oleaginosas nativas do gênero *Syagrus* utilizando marcadores microssatélites / Wassali Valadares de Sousa. – Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (58 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Agronomia, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.112>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Syagrus*. 2. Genética molecular. 3. Microssatélites (Genética). 4. Palmeira oleaginosa - Genética. I. Motoike, Sérgio Yoshimitsu, 1967-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. III. Título.

CDD 22. ed. 633.852

WASSALI VALADARES DE SOUSA

**ESTUDO GENÉTICO DE PALMEIRAS OLEAGINOSAS NATIVAS DO GÊNERO  
*Syagrus* UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

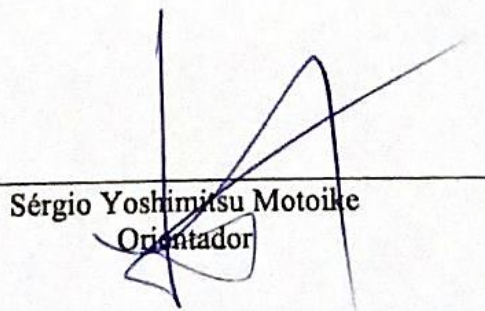
APROVADA: 04 de fevereiro de 2022.

Assentimento:



---

Wassali Valadares de Sousa  
Autor



---

Sérgio Yoshimitsu Motoike  
Orientador

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas quando tocares uma alma humana, seja apenas outra alma humana”  
(Carl Gustav Jung).*

Aos meus pais, Ernesto e Sandra, que na simplicidade dos seus conhecimentos, sempre me mostraram que o estudo é fundamental e importante, mas que isso não me torna superior a ninguém.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, por ter me dado força e sabedoria para vencer essa etapa. Pelas pessoas que colocou em meu caminho que foram importantes para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus pais, Ernesto e Sandra, pelos seus ensinamentos, me dando educação, e mostrando os verdadeiros valores da vida, pelo apoio, carinho, dedicação, e paciência nos momentos mais complicados. Meus principais motivadores e a força que sempre preciso para continuar.

Ao meu orientador Sérgio Motoike, agradeço a oportunidade e por me apresentar uma espécie tão rica do nosso país. Obrigado pela receptividade e disponibilidade de sempre, pelo apoio e ensinamentos para vida.

À minha coorientadora Milene de Figueiredo, que em nenhum momento mediu esforços para me ensinar e auxiliar durante toda pesquisa. Obrigado pela amizade, por compartilhar comigo todo seu conhecimento de formação, pelo incentivo e por me fazer crescer.

Ao meu coorientador Guilherme da Silva Pereira, agradeço a atenção e paciência em me ensinar, pela disponibilidade em atender minhas dúvidas e pelas valiosas correções.

Ao grupo REMAPE, e um agradecimento especial a Naomi Kuki, pela atenção e carinho de sempre. Obrigado por compartilhar seu conhecimento com todos. Sua felicidade e encantamento pelas pesquisas e ao ver nossos resultados é motivador.

Ao Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal (LBMV/DAA/UFV), por toda estrutura oferecida, e aos parceiros de laboratório.

À minha amada Vó Luiza (*in memoriam*) que durante sua existência sempre rezou para que meu caminho fosse iluminado e protegido pelo Divino Espírito Santo. Jamais te esquecerei.

Aos familiares e amigos pelo incentivo, dedicação e por torcerem pelo meu sucesso.

Meu agradecimento aos amigos do LPBP/UFV pela constante troca de conhecimentos.

Ao PPGGM e todo corpo docente pela oportunidade de aperfeiçoar meu conhecimento.

À UFV, pelo suporte, pelos anos aqui vividos e oportunidades profissionais recebidas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“Em algum lugar, algo incrível está  
esperando para ser descoberto”  
Carl Sagan*

## RESUMO

SOUSA, Wassali Valadares de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **Estudo genético de palmeiras oleaginosas nativas do gênero *Syagrus* utilizando microssatélites.** Orientador: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Coorientadores: Guilherme da Silva Pereira e Milene de Figueiredo.

As palmáceas estão presentes em quase todo território brasileiro. As palmeiras do gênero *Syagrus* possuem muitas espécies produtoras de frutos comestíveis e de grande potencial oleaginoso, como *Syagrus glaucescens* (palmeirinha-azul) e *S. coronata* (licuri). A primeira é uma palmeira endêmica em extinção, cujas últimas populações estão localizadas restritamente na Serra do Espinhaço em Minas Gerais. A segunda é representativa da Caatinga, e apresenta valores significativos de óleo na constituição de seus frutos, sendo de grande importância nas comunidades locais do Nordeste. Estudos genéticos com ambas as espécies são importantes uma vez que suas populações nativas estão em constante degradação, o que pode causar uma perda irreparável de diversidade genética. Os marcadores microssatélites quantificam e caracterizam a diversidade genética das populações a partir de índices genéticos. Estimar a diversidade genética de espécies ameaçadas e constantemente exploradas é fundamental para conservação e manejo sustentado. Este trabalho realizou um estudo genético com as duas palmeiras utilizando marcadores microssatélites. Foram analisados 67 acessos da palmeira *S. coronata* de quatro áreas de coleta no Norte de MG e 14 acessos de *S. glaucescens* de duas procedências. Os 15 pares de *primers* microssatélites testados permitiram obter 8 locos polimórficos para *S. glaucescens* na transferibilidade de locos a partir da palmeira *S. coronata*. O estudo de diversidade genética de *S. coronata* foi realizado a partir de 13 locos polimórficos, tendo um total 124 alelos, com uma média de 5 alelo/loco. As heterozigosidades observada e esperada obtiveram um valor médio de 0,35 e 0,62, respectivamente. Dentre as variáveis da estrutura populacional, o  $F_{IS}$  da espécie estimado para todos os alelos foi de 0,30, o  $F_{ST} = 0,02$ , resultando em um fluxo gênico estimado de 12,25. O estudo de transferibilidade de locos entre as espécies *S. coronata* e *S. glaucescens* se mostrou efetivo. Os acessos nativos de *S. coronata* apresentaram elevado grau de diversidade genética, principalmente dentro das populações. O fluxo gênico alto e a proximidade entre as localidades de coleta contribuíram para obtenção da baixa variabilidade genética entre as populações. Quando analisadas em conjunto, as populações de *S. coronata* e *S. glaucescens* mostram uma grande distância genética, mas com

uma ligação ancestral entre si. As informações obtidas subsidiam estudos genéticos futuros, contribuindo para a sua conservação e pré-melhoramento das duas espécies.

**Palavras-chave:** *Syagrus*. Genética molecular. Microssatélites. Oleaginosas.



## ABSTRACT

SOUSA, Wassali Valadares de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2022. **Genetic study of native oilseed palms of the genus *Syagrus* using microsatellites**. Adviser: Sérgio Yoshimitsu Motoike. Co-advisers: Guilherme da Silva Pereira and Milene de Figueiredo.

Palm trees are present in almost all Brazilian territory. The palm trees of the genus *Syagrus* have many species that produce edible fruits and have great potential for oil production, such as *Syagrus glaucescens* and *S. coronata*. The first species is an endemic palm tree under extinction risk. Its last populations are located in the Serra do Espinhaço, Minas Gerais. The second species is found in the Caatinga biome. It presents oil-rich fruits, which makes them of great importance in the local communities of the Northeast. Genetic studies with both species are important since their native populations are in constant degradation, which might result in an irreparable loss of genetic diversity. Microsatellite markers can be used to quantify and characterize the genetic diversity of populations. Estimating the genetic diversity of endangered and constantly exploited species is fundamental for conservation and sustainable management. This work carried out a genetic study with both palm trees using microsatellite markers. Sixty-seven accessions of *S. coronata* from four collection areas in Northern MG and 14 accessions of *S. glaucescens* from two sites? were analyzed. The 15 pairs of microsatellite primers tested resulted in eight polymorphic loci for *S. glaucescens* from the transferability of loci. The genetic diversity study of the palm *S. coronata* was carried out with 13 polymorphic loci, resulting in a total of 124 alleles, with an average of 5 allele/locus. The observed and expected heterozygosity an average value of 0.35 and 0.62, respectively. Regarding population structure,  $FIS = 0.30$ , and  $FST = 0.02$ , resulting in an estimated gene flow of 12.25. The locus transferability study between *S. coronata* and *S. glaucescens* species proved effective. The native accessions of *S. coronata* showed a high degree of genetic diversity, especially within populations. The high gene flow and the proximity between the collection sites contributed to the low genetic variability among populations. *S. coronata* and *S. glaucescens* show a large genetic distance between them. The information obtained subsidizes future genetic studies, contributing to the conservation and pre-improvement of the two species.

**Keywords:** *Syagrus*. Molecular genetics. Microsatellites. Oilseeds.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição dos acessos de licuri (1, 2, 3 e 4) e palmeirinha azul (5 e 6) na região do estado de Minas Gerais.....20

### **CAPÍTULO I- TRANSFERIBILIDADE DE LOCOS EM *Syagrus glaucescens* Glaz. ex Becc.: SELEÇÃO DE MARCADORES SSR PARA ESTUDOS DE CONSERVAÇÃO DESTA ESPÉCIE ENDÊMICA E EM EXTINÇÃO**

Figura 1- Perfil de um gel de poliacrilamida 6% utilizando o primer SYA117 para 14 plantas de palmeirinha azul e 2 plantas de licuri..... 33

Figura 2- Riqueza de alelos a partir dos oito *primers* SSR polimórficos..... 34

Fig 3- Agrupamento UPGMA com base na distancia genética de Nei entre 14 genótipos de *S. glaucescens* ..... 35

### **CAPITULO II- DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS NATIVOS DA PALMEIRA LICURI (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc.) E ESTUDO COMPARATIVO COM A PALMEIRINHA AZUL (*Syagrus glaucescens* Glaz. ex Becc.)**

Figura 1- Consumo global de óleo de palma. (A- Gráfico de produção e consumo de óleo de palma a nível mundial; B- Mapa geográfico de distribuição do licuri; C- Cacho de frutos do licuri; D- Óleo de licuri extraído para comércio..... 41

Figura 2- Análise de Componentes Principais na matriz de genótipos de *S. glaucescens* e *S. coronata*, coletados no norte de Minas Gerais. .... 46

Figura 3- Análise de Componentes Principais na matriz de genótipos de *S. coronata*..... 47

Figura 4- Padrão de estruturação genética entre 4 procedências de *S. coronata* e 2 procedências de *S. glaucescens*, definido pelo agrupamento UPGMA, com base nas distancias genéticas de Nei (1978). .... 48

Figura 5- Padrão de estruturação genética entre 4 procedências de licuri (Jaíba- 1 a 21; Capitão Enéias- 22 a 46; Rio Pardo de Minas: 47 a 66; Salinas: 67), definido pelo agrupamento UPGMA, com base nas distancias genéticas de Nei (1978). .... 49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Procedência dos genótipos de *Syagrus coronata* (licuri) e *S. glaucescens* (palmeirinha –azul), coletados no norte de Minas Gerais ..... 21

Tabela 2- Georreferenciamento dos 67 acessos de *S. coronata* e 14 de *S. glaucescens*, obtidos de seis localizações distintas..... 21

Tabela 3: Características dos marcadores microssatélites utilizados para genotipagem das espécies estudadas..... 24

### **CAPÍTULO I- TRANSFERIBILIDADE DE LOCOS EM *Syagrus glaucescens* Glaz. ex Becc.: SELEÇÃO DE MARCADORES SSR PARA ESTUDOS DE CONSERVAÇÃO DESTA ESPÉCIE ENDÊMICA E EM EXTINÇÃO**

Tabela 1- Características de marcadores microssatélites de amplificação cruzada..... 33

### **CAPITULO II- DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS NATIVOS DA PALMEIRA LICURI (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc.) E ESTUDO COMPARATIVO COM A PALMEIRINHA AZUL (*Syagrus glaucescens* Glaz. ex Becc.)**

Tabela 1- Diversidade genética e endogamia de 13 locos microssatélites em plantas jovens de *S. coronata* ..... 44

Tabela 2- Estimativa de parâmetros genéticos de diversidade em três localidades de ocorrência natural de *S. coronata*. ..... 45

Tabela 3- Distribuição da diversidade genética de 67 acessos de *S. coronata* do norte de Minas Gerais. .... 46

## LISTA DE ABREVIACOES

**Ae**- Número de alelos efetivos

**D<sub>ST</sub>**- Diversidade entre populações

**F<sub>IS</sub> ou *f***– Índice de fixação

**F<sub>IT</sub>**- Índice de fixação total

**F<sub>ST</sub>**- Índice de fixação entre populações

**H<sub>e</sub>**- Heterozigosidade esperada

**H<sub>o</sub>**- Heterozigosidade observada

**H<sub>s</sub>**- Diversidade genética intrapopulacional

**H<sub>t</sub>**- Diversidade genética total

**IUCN**- União Internacional para a Conservação da Natureza

**K**- Número de alelos

**MAF**- Frequência do menor alelo

**n**- Número de indivíduos

**N<sub>m</sub>**- Fluxo gênico

**PCA**- Análise de Componentes Principais

**SSR**- *Simple Sequence Repeats*

**T<sub>a</sub>**- Taxa de cruzamento aparente

**T<sup>o</sup><sub>m</sub>**- Temperatura de *melting*

**UPGMA**- Unweighted pair-group method using arithmetic averages

**Z**- Correlação de Mantel

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	14
1.1. Licuri.....	15
1.2. Palmeirinha Azul.....	16
1.3. Marcadores microssatélites e o melhoramento.....	17
2. OBJETIVO GERAL.....	19
2.1. Objetivos específicos.....	19
3. METODOLOGIA GERAL.....	19
3.1. Área de estudo e coleta de material vegetal.....	20
3.2. Extração e qualidade do DNA genômico.....	23
3.3. Escolha dos marcadores microssatélites e otimização.....	23
3.4. Amplificação do DNA por PCR.....	25
REFERÊNCIAS.....	26
<b>CAPÍTULO I- TRANSFERIBILIDADE DE LOCOS EM <i>Syagrus Glaucescens</i> Glaz. ex Becc. : SELEÇÃO DE MARCADORES SSR PARA ESTUDOS DE CONSERVAÇÃO DESTA ESPÉCIE ENDEMICA E EM EXTINÇÃO.....</b>	<b>29</b>
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. METODOLOGIA.....	32
2.1. Material vegetal, obtenção do DNA e transferibilidade de marcadores ( <i>S. coronata</i> para <i>S. glaucescens</i> ).....	32
2.2. Análise de dados.....	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4. CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS.....	36
<b>CAPITULO II- DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS NATIVOS DA PALMEIRA LICURI (<i>Syagrus coronata</i> (Mart.) Becc.) E ESTUDO COMPARATIVO COM A PALMEIRINHA AZUL (<i>Syagrus glaucescens</i> Glaz. ex Becc.).....</b>	<b>38</b>
1. INTRODUÇÃO.....	40
2. METODOLOGIA.....	42
2.1. Material vegetal, obtenção do DNA genômico e genotipagem de <i>S. coronata</i> com marcadores microssatélites.....	42
2.2. Análise dos dados.....	42

3. RESULTADOS.....	43
3.1. Diversidade genética, endogamia e divergência genética populacional em <i>S. coronata</i> . .....	44
3.2. Estrutura genética e fluxo gênico.....	45
3.3. Agrupamento de componentes principais (PCA) a partir dos dados moleculares .....	46
3.4. Agrupamento UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages) ....	47
4. DISCUSSÃO .....	49
5. CONCLUSÃO.....	53
6. CONCLUSÃO GERAL .....	54
REFERÊNCIAS .....	56

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O território brasileiro é marcado por uma rica flora. As palmáceas, em particular, se fazem presentes em quase todo território. São de grande importância na economia de subsistência e alto potencial socioeconômico para as comunidades locais e tradicionais (JARDIM e STEWART, 1994), especialmente nas regiões Norte e Nordeste, onde se encontram as populações mais vulneráveis. Noblick (1986) afirma que depois das gramíneas, as palmeiras são o segundo grupo dentre as monocotiledôneas em termos de importância econômica; e, conforme a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) (1996), constitui, dentre todos os grupos vegetais, a terceira família mais utilizável do mundo, ficando atrás apenas das gramíneas e leguminosas.

Há uma grande quantidade e diversidade de palmeira nativas no Brasil, as quais possuem diversas aplicações (DA SILVA *et al.*, 2019). Por exemplo, a presença endêmica e a alta produção de óleo por unidade de área, sobretudo em comparação com outras espécies oleaginosas, são as principais vantagens das palmáceas oleaginosas. Stachiw *et al.* (2016) postulam que essas palmeiras representam um forte apoio à agricultura familiar proporcionando melhorias na qualidade de vida em regiões carentes por meio da valorização do potencial regional. A exploração de espécies oleaginosas nativas pode servir de base para um modelo de desenvolvimento tecnológico e industrial autossustentado (BARBOSA *et al.* 2009; VILELLA *et al.*, 2014).

O gênero *Syagrus* pertence à família Arecaceae, possuindo atualmente 65 espécies, 2 subespécies e 14 híbridos naturais. O gênero é distribuído por toda a região Neotropical, sendo bastante restrito à América do Sul (NOBLICK, 2017), e tendo o Brasil central e oriental como o centro de sua distribuição. Apesar da nítida importância para economia nacional, e a grande biodiversidade da família Arecaceae, há poucos estudos quanto ao potencial e a aptidão agronômicos das espécies nativas, incluído as do gênero *Syagrus*, as quais podem se tornar verdadeiras culturas agrícolas.

Devido a todo seu benefício gerado, espécies deste gênero vem sofrendo degradação de suas populações nativas, ocasionado por práticas agrícolas inapropriadas, gerando perdas irreversíveis de variabilidade genética em áreas de ocorrência natural. Deste modo, atenção deve ser direcionada a estudos relacionados à caracterização ecológica, variabilidade genética, conservação de germoplasma, seleção de genótipos superiores e desenvolvimento de métodos eficientes de propagação. Neste contexto, faz-se necessário conservar as espécies e subsidiar o desenvolvimento de futuros trabalhos de melhoramento genético.

### 1.1- Licuri

O licuri, *Syagrus coronata* Martinus., é uma palmeira nativa do Brasil, povoando preferencialmente as regiões secas e áridas da Caatinga, abrangendo o norte de Minas Gerais e o semiárido nordestino, onde ocupa principalmente a porção oriental e central da Bahia até o sul do Pernambuco (NOBLICK, 1986). Nestas áreas, o licuri serve como fonte de alimento e desenvolvimento local. Suas amêndoas são consumidas *in natura* pelas populações e empregadas para a fabricação de produtos alimentícios (BONDAR, 1938); folhas e endocarpo são utilizados na fabricação de artesanato regional (LORENZI et al., 2004); e o óleo extraído, considerado de alta qualidade, é utilizado como alimento e na produção de sabão.

Caracteriza-se por apresentar porte mediano, atingindo cerca de dez metros de altura e 25 cm de diâmetro, sempre apresentando estipe único. As folhas de coloração verde clara atingem comprimento de até três metros, e se distribuem sempre em cinco fileiras arranjadas. As flores são pouco atraentes por serem muito pequenas, geralmente desprovidas de colorido vistoso, hermafroditas não funcionais ou unissexuadas, podendo apresentar representantes tanto dioicos como monoicos, sendo estes últimos os mais comuns (ALVES e DEMATTÊ, 1987). A inflorescência possui 23 compostos voláteis no aroma emitido, que não diferem entre as fases masculina e feminina (BARBOSA *et al.*, 2021). A composição química do perfume floral indica que a palmeira desenvolveu estratégias para ser predominantemente polinizada por gorgulhos de pequeno porte. De fato, Barbosa (2021) constatou que suas inflorescências são predominantemente visitadas por uma variedade de besouros, cuja riqueza e abundância variam ao longo das diferentes fases de antese.

O licuri é de grande importância ecológica para diversas espécies de aves (como araras, maracanãs, papagaios e periquitos) que se alimentam de seus frutos (AROUCHA & AROUCHA, 2013). A drupa do licuri é uma das fontes primárias de alimentação da arara-azul-de-lear (*Anodorhynchus leari*). Esses agentes dispersores de sementes são capazes de espalhá-las por várias áreas, o que garante uma maior distribuição espacial e contribuindo para o fluxo genético e a variabilidade genética.

A espécie é diploide contendo 16 pares de cromossomos ( $2n=32$ ) (LAM,1998), sendo sua propagação exclusivamente sexuada/ seminífera. Entretanto, Rocha (2009) concluiu que *S. coronata* apresenta sistema reprodutivo misto devido à ocorrência de polinização cruzada e possibilidade de autofecundação decorrente da sincronia entre as fenofases masculina e feminina em uma mesma planta, haja vista que não há autoincompatibilidade polínica. Ela é classificada como xenógama facultativa, muito embora presente elevadíssima razão Pólen /



Óvulo (ROCHA, 2009). O fluxo intenso de visitação nas inflorescências indica a sua provável elevada contribuição para a xenogamia na espécie, e, adicionalmente, reflete a importância da floração contínua como estratégia para assegurar a presença constante de polinizadores. Esta atividade influencia tanto o sucesso reprodutivo da planta, como os padrões reprodutivos e o fluxo gênico (ABREU, 2001).

A frutificação ocorre seis anos após o plantio e a produção média anual em um licurizal nativo é de 2.000 kg/ha de frutos e, sob técnicas e manejo adequado (poda de folhas velhas, capinadas plantas daninhas, adubação, etc.), a produção de frutos pode alcançar até 4.000 kg/ha (DRUMOND, 2007).

Segundo Crepaldi *et al.* (2001), em termos de composição nutricional, os frutos são considerados altamente energéticos, tendo em vista que apresentam um valor calórico de 635,9 kcal/100 g, distribuídos em 108,6 kcal/100 g para a polpa e 527,3 kcal/100 g para a amêndoa. A constituição bioquímica da amêndoa é equivalente a 49,2% de lipídeos e 11,5% de proteínas; enquanto que a polpa dos frutos apresenta um teor de carboidratos totais equivalente a 13,2%. Neves (2021) afirma que genótipos de licuri oriundos da região Norte de Minas Gerais possuem uma produção de óleo significativo na polpa e na amêndoa, superior a 20% na polpa e a 50% na amêndoa. Existe uma grande variabilidade na composição de ácidos graxos na amêndoa, o que torna esta uma espécie atrativa do ponto de vista industrial devido a gama de aplicações (Neves, 2021).

## **1.2- Palmeirinha Azul**

A espécie *Syagrus glaucescens* Glaz. ex Becc., é conhecida popularmente como palmeirinha azul ou coco de pedra. Endêmica da Serra do Espinhaço, a palmeira apresenta grande importância ecológica por ser uma fonte preferencial de alimento para muitas espécies de aves, algumas delas altamente vulneráveis, como a arara-azul-de-lear.

Ela se caracteriza principalmente pelo caule solitário e decumbente, geralmente arqueado, e, em condições normais, frutifica durante a primavera e verão. Multiplica-se apenas por sementes, cuja germinação é baixa e pode demorar seis meses ou mais (LORENZI *et al.*, 2010; NOBLICK, 2017). Os indivíduos podem atingir até 4 m de altura, possuem crescimento lento e são geralmente encontrados agrupados em pequenas subpopulações (MIOLA *et al.*, 2010). Apresenta pico de floração sazonal com data média no mês de maio, início da estação seca, com pico de frutificação com data média em novembro, durante a estação chuvosa e pico de

dispersão de sementes com data média em janeiro, auge da estação chuvosa (BELO *et al.*, 2013).

Em seu estudo sobre a distribuição espacial da espécie, Miola (2011) observou que a distribuição de *S. glaucescens* foi fortemente associada aos afloramentos rochosos, possivelmente ditada por uma associação entre afloramentos de quartzito, altitude, declividade, estado nutricional do solo e variáveis bióticas, como a presença de dispersores de sementes. Os indivíduos de *S. glaucescens* costumam apresentar sistema radicular associado a fendas de rochas, de forma que, muitas vezes, os indivíduos apresentam grande deformação de estipe (MIOLA; FERNANDES, 2015).

Contudo, *S. glaucescens* vem tendo sua ocorrência ameaçada. Além do comércio ilegal de indivíduos para fins ornamentais, a pressão mineraria tem contribuído para desaparecimento da espécie, especialmente dado sua associação direta com os afloramentos de quartzito, material mineral de forte apresso no mercado internacional. Por conseguinte, é cada vez mais visível a necessidade da realização de ações para a conservação desta espécie ameaçada de extinção.

### 1.3- Marcadores microssatélites e o melhoramento

O melhoramento genético tem sido um dos grandes responsáveis pelos avanços na agricultura, com o desenvolvimento de cultivares superiores, quer pela maior produtividade, quer pela melhor adaptação aos ambientes adversos. O sucesso de um programa de melhoramento genético depende fundamentalmente de algumas etapas como a escolha de genitores que produzam indivíduos com a melhor combinação de alelos favoráveis, e a seleção de genótipos superiores em populações segregantes.

Para Hughes *et al.* (2008), a diversidade genética é considerada um componente-chave da biodiversidade, não somente importante em processos evolutivos, como também interferindo em processos ecológicos. As variações morfológicas e fisiológicas entre plantas e populações são consideradas relevantes diante das pressões de seleção do ambiente, sendo essas variações resultantes da variabilidade de alelos presentes na população (YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996). Assim, em termos de definição, a diversidade genética quantifica essa variabilidade genética existente (HUGHES *et al.*, 2008).

Uma potente ferramenta para auxiliar o melhoramento são os marcadores moleculares, que permitem quantificar e caracterizar a diversidade genética das populações a partir de índices genéticos comumente utilizados em estudos de genética de populações, tais como: as frequências de genótipos e alelos, a proporção de loci polimórficos, a heterozigosidade

observada e esperada ou ainda por meio do parâmetro de diversidade alélica (TORO; CABALLERO, 2005). A riqueza alélica é um componente extremamente afetado pelas mudanças no tamanho populacional, e é caracterizado pelo número de alelos existentes na amostra (NAMKOONG *et al.*, 2005), sendo este parâmetro considerado relevante para estudos em programas de conservação (PETIT; EL MOUSADIK; PONS, 1998). Entretanto, o índice mais conhecido e utilizado é a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ).

Os genomas eucarióticos apresentam várias classes de sequências repetidas e uma delas consiste de repetições em tandem de 1 a 6 nucleotídeos, sendo denominadas microsatélites ou SSR (*Simple sequence repeat*) (CAIXETA *et al.*, 2009). As regiões genômicas que flanqueiam as sequências repetidas são conservadas dentro de uma espécie, permitindo o desenho de pares de *primers* entre 20 e 30 pb, que são utilizados para amplificar os as regiões contendo microsatélites. Os polimorfismos no tamanho dos fragmentos amplificados devem-se às diferenças no número de elementos simples repetidos, necessitando de géis de alta resolução para a separação dos fragmentos, uma vez que estes diferem por poucos pares de base (CAIXETA *et al.*, 2009).

Em plantas, os microsatélites foram rapidamente implementados em várias espécies e são utilizados até hoje na construção de mapas genéticos, nos estudos de diversidade e no melhoramento assistido. Dentre as vantagens que tornaram esses marcadores largamente utilizados podem-se destacar a alta frequência e a distribuição ao acaso nos genomas eucariotos, além de serem *codominantes* e multialélicos, fornecendo um elevado nível de informação genética por loco (ZOLET *et al.*, 2017). A técnica de SSR é de fácil execução e altamente reproduzível, quando comparada com outras metodologias. Uma limitação da técnica é a obtenção dos *primers* específicos que flanqueiam os microsatélites, requerendo a construção de bibliotecas genômicas enriquecidas, o sequenciamento e o desenho dos *primers* (CAIXETA *et al.*, 2009). Tal limitação tem sido superada com os avanços nas técnicas moleculares, incluindo o sequenciamento em grande escala.

É urgente a necessidade de estabelecimento de ações de conservação para as palmeiras brasileiras vulneráveis como o licuri e a palmeirinha azul, posto à incomensurável importância dessas espécies para as populações rurais tradicionais e a fauna. Compete adotar modelos sustentáveis de exploração dos recursos, que se mostrem efetivamente capazes de assegurar a continuidade de uso e que concorram concomitantemente para a melhoria na qualidade de vida do povo local, ao tempo em que garantam a adequada oferta de recursos para a fauna silvestre.

## 2- OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como meta estudar duas palmeiras oleaginosas nativas do gênero *Syagrus* da região norte de Minas Gerais, utilizando marcadores microssatélites, embasando estudos futuros de conservação e ações de pré-melhoramento.

### 2.1- Objetivos específicos

- a- Obtenção do DNA genômico de qualidade dos genótipos de *S. coronata* e *S. glaucescens*.
- b- Realizar transferibilidade de locos microssatélites entre as espécies *S. coronata* com *S. glaucescens* de forma efetiva.
- c- Selecionar *primers* efetivos para *S. glaucescens* embasando estudos populacionais futuros.
- d- Estimar parâmetros de diversidade genética dos acessos nativos de licuri provenientes da porção norte de Minas Gerais;
- e- Realizar uma comparação baseada em distância genética entre as espécies *S. coronata* e *S. glaucescens*.

Os resultados deste trabalho são apresentados nos dois capítulos que compõem esta dissertação:

No **capítulo 1**, intitulado “Transferibilidade de locos em *S. glaucescens*: Seleção de marcadores SSR para estudos de conservação desta espécie endêmica e em extinção”, são apresentados os resultados da amplificação cruzada de locos entre duas espécies do gênero *Syagrus*, servindo como base de estudos futuros de conservação.

No **capítulo 2**, intitulado “Diversidade genética de acessos nativos da palmeira licuri (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc.) e estudo comparativo com a palmeirinha azul (*Syagrus glaucescens* Glaz. ex Becc.)”, são apresentados os resultados dos parâmetros de diversidade genética e estrutura populacional da palmeira licuri nativa localizada na região norte de Minas Gerais.

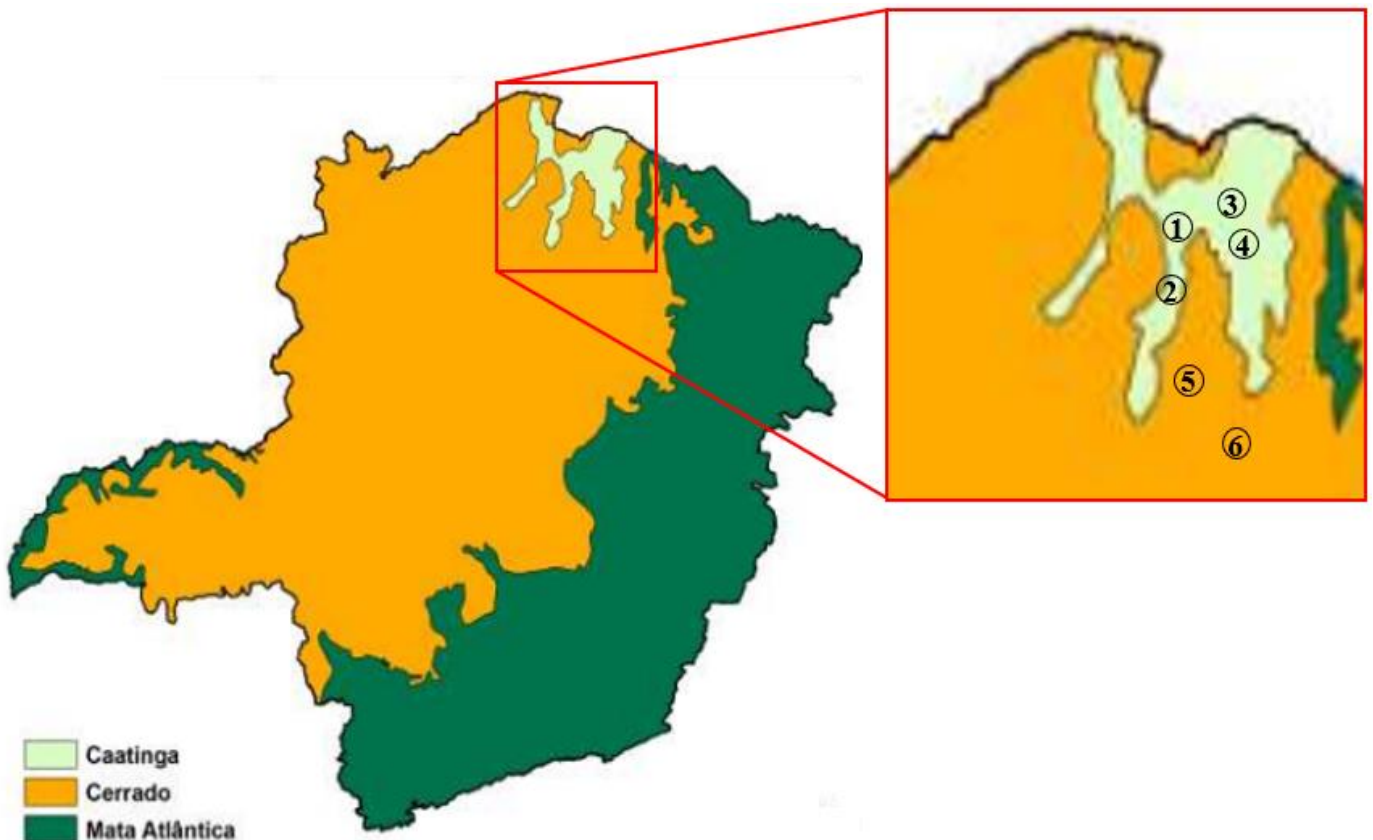
## 3-METODOLOGIA GERAL

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal, localizado na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão (UEPE) /Pomar Campus pertencente ao Departamento de Agronomia (DAA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

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

Entre dezembro de 2019 e março de 2020, Neves *et al* (2021) realizou expedições de campo para identificação e coleta de material vegetal de populações naturais de licuri e palmeirinha azul. O local de coleta abrangeu o Norte do Estado de Minas Gerais, especialmente os municípios de Capitão Enéas, Jaíba, Rio Pardo de Minas, Salinas, Olhos D'água e Couto de Magalhães (Figura 1). Os frutos maduros coletados foram encaminhados para o Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal, onde foram germinados e plantados em sacos plásticos. As mudas jovens obtidas foram empregadas no desenvolvimento do presente trabalho para obtenção do DNA genômico a partir das folhas de *S. coronata* e *S. glaucescens*. Foram utilizados 67 acessos de licuri provenientes de quatro localidades, e 14 acessos de palmeirinha azul provenientes de duas localidades (Tabela 1).

Figura 1: Distribuição dos acessos de licuri (1, 2, 3 e 4) e palmeirinha azul (5 e 6) na região do estado de Minas Gerais.



1- Jaíba; 2- Capitão Enéas; 3- Rio Pardo de Minas; 4- Salinas; 5- Olhos D'água; 6- Couto de Magalhães

Fonte: IBGE, 2014 (Adaptada)

Tabela 1- Procedência dos genótipos de *Syagrus coronata* (licuri) e *S. glaucescens* (palmeirinha –azul), coletados no norte de Minas Gerais

Genótipos	Procedência/ Município
<i>S. coronata</i>	
1 a 21	Jaíba (1)
22 a 46	Capitão Enéas (2)
47 a 66	Rio Pardo de Minas (3)
67	Salinas (4)
<i>S. glaucescens</i>	
1 a 11	Olhos D'água(5)
12 a 14	Couto de Magalhães(6)

Para o georreferenciamento das matrizes foi utilizado receptor GPS (*Global Positioning System*) modelo 60 CSX-Garmin para coleta de dados como latitude, longitude e altitude (Tabela 2).

Tabela 2- Georreferenciamento dos 67 acessos de *S. coronata* e 14 de *S. glaucescens*, obtidos de seis localizações distintas.

ESPÉCIE	ACESSO	LATITUDE	LONGITUDE	ALTITUDE_(m)
<i>S. coronata</i>	1	S15° 20' 52.40278"	W43° 42' 19.18581"	476.215
	2	S15° 20' 52.40278"	W43° 42' 19.18581"	476.215
	3	S15° 20' 05.69845"	W43° 48' 53.25338"	513.466
	4	S15° 20' 05.69845"	W43° 48' 53.25338"	513.466
	5	S15° 20' 05.69845"	W43° 48' 53.25338"	513.466
	6	S15° 20' 05.69845"	W43° 48' 53.25338"	513.466
	7	S15° 19' 43.74776"	W43° 48' 53.67462"	518.032
	8	S15° 19' 43.74776"	W43° 48' 53.67462"	518.032
	9	S15° 20' 46.67228"	W43° 42' 14.85300"	479.820
	10	S15° 20' 46.67228"	W43° 42' 14.85300"	479.820
	11	S15° 20' 47.51748"	W43° 44' 26.80944"	479.099
	12	S15° 20' 49.85633"	W43° 44' 28.93586"	482.944
	13	S15° 20' 45.11827"	W43° 44' 27.12145"	483.185
	14	S15° 20' 45.11827"	W43° 44' 27.12145"	483.185
	15	S15° 20' 45.11827"	W43° 44' 27.12145"	483.185
	16	S15° 20' 45.31743"	W43° 44' 24.94162"	485.348
	17	S15° 20' 45.31743"	W43° 44' 24.94162"	485.348
	18	S15° 20' 37.38989"	W43° 44' 21.39969"	483.665
	19	S15° 20' 37.38989"	W43° 44' 21.39969"	483.665
	20	S15 14' 23.71992"	W43 41' 11.04013"	473.091
	21	S15 14' 39.48568"	W43 41' 51.83472"	548.314

S. coronata

22	S16° 12' 19.75206"	W43° 35' 47.20544"	592.294
23	S16° 12' 24.80695"	W43° 35' 50.28720"	593.255
24	S16° 11' 10.45642"	W43° 34' 34.03746"	582.200
25	S16° 11' 11.71501"	W43° 34' 35.24928"	580.517
26	S16° 11' 11.65315"	W43° 34' 35.31416"	579.316
27	S16° 11' 11.65315"	W43° 34' 35.31416"	579.316
28	S16° 11' 11.65315"	W43° 34' 35.31416"	579.316
29	S16° 11' 11.65315"	W43° 34' 35.31416"	579.316
30	S16° 11' 11.65315"	W43° 34' 35.31416"	579.316
31	S16° 11' 11.65315"	W43° 34' 35.31416"	579.316
32	S16° 11' 07.98661"	W43° 34' 47.36267"	586.285
33	S16° 11' 08.68516"	W43° 34' 46.32888"	584.843
34	S16° 11' 09.94405"	W43° 34' 40.21304"	588.208
35	S16° 11' 09.42203"	W43° 34' 35.35459"	588.929
36	S16 11' 14.70051"	W43 34' 41.13911"	546.391
37	S16 11' 14.70051"	W43 34' 41.13911"	546.391
38	S16 11' 06.55843"	W43 34' 43.90645"	579.796
39	S16 11' 06.55843"	W43 34' 43.90645"	579.796
40	S16 11' 05.14625"	W43 34' 43.91369"	579.796
41	S16 11' 02.49509"	W43 34' 41.99698"	582.200
42	S16 11' 10.18666"	W43 34' 35.47408"	580.517
43	S16 11' 10.33663"	W43 34' 33.91042"	580.998
44	S16 11' 13.58253"	W43 34' 35.27795"	580.517
45	S16 11' 13.58253"	W43 34' 35.27795"	580.517
46	S16 11' 13.58253"	W43 34' 35.27795"	580.517
47	S15 44' 58.58776"	W42 20' 40.45348"	716.303
48	S15 44' 58.58776"	W42 20' 40.45348"	716.303
49	S15 44' 58.58776"	W42 20' 40.45348"	716.303
50	S15 44' 58.58776"	W42 20' 40.45348"	716.303
51	S15 44' 58.58776"	W42 20' 40.45348"	716.303
52	S15 44' 57.52832"	W42 20' 41.66711"	712.938
53	S15 44' 57.52832"	W42 20' 41.66711"	712.938
54	S15 44' 57.52832"	W42 20' 41.66711"	712.938
55	S15 44' 57.52832"	W42 20' 41.66711"	712.938
56	S15 44' 57.52832"	W42 20' 41.66711"	712.938
57	S15 44' 57.52832"	W42 20' 41.66711"	712.938
58	S15 44' 57.52832"	W42 20' 41.66711"	712.938
59	S15 45' 07.76091"	W42 20' 47.68579"	751.871
60	S15 45' 07.76091"	W42 20' 47.68579"	751.871
61	S15 45' 07.76091"	W42 20' 47.68579"	751.871
62	S15 45' 07.76091"	W42 20' 47.68579"	751.871
63	S15 45' 07.76091"	W42 20' 47.68579"	751.871
64	S15 45' 07.76091"	W42 20' 47.68579"	751.871
65	S15 45' 07.76091"	W42 20' 47.68579"	751.871
66	S15 45' 07.76091"	W42 20' 47.68579"	751.871
67	S16 8' 36.00400"	W42 18' 11.15484"	786.000

<i>S. glaucescens</i>	1	S17° 34' 12.67412"	W43° 40' 59.12952"	1.053.002
	2	S17° 34' 30.58410"	W43° 41' 01.98858"	1.024.163
	3	S17° 34' 30.42930"	W43° 41' 03.27705"	1.029.930
	4	S17° 34' 31.37619"	W43° 40' 57.86519"	1.022.240
	5	S17° 34' 31.17070"	W43° 40' 57.30092"	1.022.480
	6	S17° 34' 33.01589"	W43° 40' 56.21976"	1.013.588
	7	S17° 34' 05.47198"	W43° 41' 08.52928"	1.074.391
	8	S17° 32' 28.83913"	W43° 43' 31.88518"	1.109.239
	9	S17° 32' 28.27848"	W43° 43' 31.41958"	1.112.844
	10	S17° 32' 28.90341"	W43° 43' 30.14288"	1.110.681
	11	S17° 32' 10.92281"	W43° 43' 57.73929"	1.109.239
	12	S18° 06' 21.18357"	W43° 29' 43.31514"	834.784
	13	S18° 08' 28.19103"	W43° 30' 32.31397"	721.590
	14	S18° 06' 08.94495"	W43° 29' 16.75010"	782.633

### 3.2- Extração e qualidade do DNA genômico

A extração do DNA genômico do tecido foliar foi realizada a partir de 30 mg de amostras maceradas em nitrogênio líquido com auxílio do grau e pistilo. O material macerado foi transferido para microtubos Eppendorf de 2 mL. O processo de extração do DNA genômico das folhas foi realizado por meio do protocolo CTAB 2% proposto por Doyle e Doyle (1991), com adaptações.

A qualidade do DNA extraído foi avaliada em gel de agarose 1% e a quantidade do DNA mensurada em Espectrofotômetro de microplacas Multiskan™ GO Termofisher. Foram usados os comprimentos de onda de 230 nm, 260 nm, 280 nm e 320 nm para quantificar o sal, DNA, proteínas e outros contaminantes, respectivamente. Após a verificação da qualidade e quantidade do material genético, o mesmo foi diluído para a concentração de 30 ng/μL e armazenado a -20 °C até o uso.

### 3.3- Escolha dos marcadores microsatélites e otimização

Os *primers* microsatélites de *S. coronata* obtidos por Barbosa *et al.* (2019) (Tabela 3) foram selecionados para avaliar a transferibilidade de locos com a espécie *S. glaucescens* e para o estudo de diversidade genética da palmeira licuri. Visando a padronização das condições ótimas de amplificação, foram realizados testes de concentração do MgCl<sub>2</sub> variando em 0.5 mM, entre 1 mM e 2 mM. As temperaturas de anelamento (T<sup>o</sup>a) de cada par de *primers* utilizados na otimização foram calculados dois graus a baixo e acima a partir da T<sub>m</sub> (temperatura de *melting*) sugerida pelo fabricante, e variando em 1 °C.



O programa utilizado para amplificação teve uma fase de desnaturação inicial a 95 °C por 4 min e ao final, uma extensão por 10 min à 72 °C. Os quarenta ciclos de amplificação contiveram 30 segundos de desnaturação a 95 °C, 30 segundos de anelamento dos *primers* com variação na temperatura e um tempo de extensão que foi ajustado de acordo com os fragmentos amplificados, considerando que a eficiência de extensão da enzima é de 1000 pb por minuto. Os produtos da PCR foram revelados em gel de acrilamida 6% corados com prata seguindo a metodologia descrita por Creste et al. (2001). As concentrações de MgCl<sub>2</sub> e as temperaturas que permitiram a melhor resolução e visualização dos alelos polimórficos para cada loco foram selecionados para análise posterior.

Tabela 3: Características dos marcadores microssatélites utilizados para genotipagem das espécies estudadas.

Loco	<i>Primers</i>	Motivos	Amplitude alélica (pb)	Ta(°C)
SYA53	F: TGC ATT GTC GTC GTA GTG GT R: GCT TTT CGC TCA CAA ACA GC	TCC <sub>(11)</sub>	268-274	59
SYA54	F: TAG GGC TTC CTC CGC TAA GA R: GGT CCA AGA TCC CTT CCA AGG	TC <sub>(10)</sub>	256-276	60
SYA56	F: TGT ATG CTT GTC TTG GTG CA R: ACT AAG ATC GAA ATC CAA ATC CAG T	AT <sub>(10)</sub>	279-297	59
SYA92	F: TTT AAG GGG GTG CAC CTC AC R: CAG CAA AAA CAC GGC TAA CCA	TC <sub>(17)</sub>	189-212	59
SYA100	F: CGG TAG GAG CGG GTT TAT CC R: CGG TAG GAG CGG GTT TAT CC	AATCCC <sub>(6)</sub>	282-297	58
SYA115	F: CCA GCT TTG ATA GAT ACA TGC ACA R: GCA TGG GCA AGA AGT CTC CA	AG <sub>(11)</sub>	219-239	58
SYA116	F: GCT ACC CCC GAA GAC AAA CA R: TCA GCC ATC ATT AGT CAA CTA GAG A	TGTA <sub>(9)</sub>	256-274	59
SYA117	F: AGT TCC GTG CAG ATC AAT GGT R: TGC AGA TGA GTG TCT TGC TT	AC <sub>(18)</sub>	219-226	60
SYA124	F: CCT GCC CAC CCA GCA AAA TA R: AGT TGC TCA TGA ATA GCT CTC CA	AG <sub>(11)</sub>	175-186	59
SYA126	F: CGA AAA CCG GAT CTG GGG AA	CT <sub>(15)</sub>	255-276	58

	R: AGG GAT GGT TTG TAG TGG CG			
SYA127	F: GGG TCA TGT GGC CTC ACT TA R: GCT TTA TGT TAT ATA TGA TCC GAG CT	AC <sub>(11)</sub>	278-287	58
SYA129	F: TGT GCC ATA TAC GCA TAT AGC CA R: TCC TCC CCT CTC TTA GGT GC	AAAAAG <sub>(5)</sub>	175-189	59
SYA131	F: TCA AAG CTG TGC TAT CTA TGG CA R: ACC TGG TTT GAT CTT GGC CT	TTTATA <sub>(5)</sub>	253-260	58
SYA143	F: ATT GCC GGT TGC CTC ATT TG R: TCT CGT GTT GGA GGC ATG AC	TTTTA <sub>(9)</sub>	279-300	58
SYA148	F: ACT GGG GAA AAG CAA GTG ACA R: ACC TTG CTG GGC TCC TTT TT	TTTTTC <sub>(5)</sub>	226-291	58

F=*forward*; R=*reverse*; Ta: Temperatura de anelamento

Fonte: Barbosa et al., 2019 (Adaptado)

### 3.4- Amplificação do DNA por PCR

As PCRs foram conduzidas em microtubos de PCR (8x0,2ml) em tiras para um volume final de 20  $\mu$ L, com 2  $\mu$ L de DNA genômico (30 ng/ $\mu$ L), 0,9  $\mu$ L de cada primer, Forward e Reverse (10  $\mu$ M), 0,2  $\mu$ L de Taq DNA Polimerase (5 U/ $\mu$ L), 0,45  $\mu$ L de dNTP mix (10 mM), 2  $\mu$ L de cloreto de magnésio (50 mM) e 2  $\mu$ L de tampão de PCR (10X Taq Buffer com KCl), obtendo o volume total com adição de água destilada autoclavada. As reações foram conduzidas em Termociclador (Mod. Veriti<sup>®</sup> 384-well Thermal Cyclers - ref. 4388444 / Applied Biosystems). Utilizou-se para amplificação de todos os *primers* otimizados o programa idem ao tópico anterior, com o valor de anelamento único padronizado para condição ótima conforme Tabela 3. A separação e visualização dos produtos de PCR foi realizada utilizando eletroforese em gel de acrilamida 6%, corado com nitrato de prata (REFERÊNCIA).

## REFERÊNCIAS

- Abreu, S. A. B. D. (2001). **Biologia reprodutiva de *Mauritia flexuosa* L.(Arecaceae) em vereda no município de Uberlândia–MG.**
- ALVES, M. R. P.; DEMATTÊ, M. E. S. P. (1987) **Palmeiras: características botânicas e evolução.** Campinas: Fundação Cargil, 129p.
- Aroucha, E. P. T. L.; Aroucha, M. L. (2013) **Boas Práticas de Manejo para o Extrativismo Sustentável do Licuri.** Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza.
- BARBOSA, C. M. et al. (2021) **Reproductive biology of *Syagrus coronata* (Arecaceae): sex-biased insect visitation and the unusual case of scent emission by peduncular bracts.** Plant Biology, v. 23, n. 1, p. 100-110.
- BARBOSA, S. N.; AMEIDA, C. (2019) **Genome survey and development of 15 microsatellite molecular markers in *Syagrus coronata* (Martius) Beccari (Arecaceae) by nextgeneration sequencing.** Brazilian Journal of Botany, v. 42, n. 1, p. 195-200.
- BARBOSA, B. S.; KOOLEN, H. H. F.; BARRETO, A. C.; SILVA, J. D.; FIGLIUOLO, R.; NUNOMURA, S. M. (2009) **Aproveitamento do óleo das amêndoas de tucumã do amazonas na produção de biodiesel.** ActaAmazonica, v. 39, p. 371-376.
- BELO, R. M. et al. (2013) **Reproductive and vegetative phenology of endemic shrubs from Serra do Cipó rupestrian grasslands, Southeastern Brazil.** Rodriguésia, v. 64, n. 4, p. 817-828.
- BONDAR, G. (1938) **O licurizeiro *Cocos coronata* Mart. e suas potencialidades na economia brasileira.** Salvador: Instituto Central de Fomento Econômico da Bahia. 18p.
- CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B. de; BRITO, G. G. de; SAKUYAMA, N. S. (2009) **Tipos de Marcadores Moleculares.** In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. Marcadores moleculares. 2ª Ed. Viçosa. p. 11-94.
- CREPALDI, I. C., ALMEIDA-MURADIAN, L. B., RIOS, M. D. G., PENTEADO M. V. C., SALATINO, A. (2001) **Composição nutricional do fruto de licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari).** Revista brasil. Bot., São Paulo, V.24, n.2, p.155-159.
- CRESTE, S; NETO, A. T; FIGUEIRA, A. (2001) **Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining.** Plant Molecular Biology Reporter, v. 19, n. 4, p. 299-306.
- DA SILVA, A. J. B. (2019) **Característica de alguns frutos das palmeiras nativas da Amazônia Brasileira.** Meio Ambiente, Sustentabilidade e Tecnologia–Volume 3, p. 18.
- DOYLE, J. (1991) **DNA protocols for plants.** In: Molecular techniques in taxonomy. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 283-293.
- DRUMOND, M. A. (2007) **Licuri *Syagrus coronata* (Mart.) Becc.** Embrapa Semiárido- Documentos (INFOTECA-E).

HUGHES, A.R.; INOUE, B.D.; JOHNSON, M.T.; UNDERWOOD, N.; VELLEND, M. (2008) **Ecological consequences of genetic diversity**. *Ecological Letters*, v. 11, p. 609-623.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Geociências: Mapas Temáticos. Disponível em: < [http://downloads.ibge.gov.br/downloads\\_geociencias.htm](http://downloads.ibge.gov.br/downloads_geociencias.htm)>. Acesso em: 20 jan. 2022.

IUCN - International Union for the Conservation of Nature. (1996) **Palms: Their Conservation and Sustained Utilization**. IUCN/SSC Palm Specialist Group, Cambridge, p. 116.

JARDIM, M. A. G.; STEWART, PJ (1994) **Aspectos etnobotânicos e ecológicos de almeiras no município de Novo Airão, Estado do Amazonas, Brasil**. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série botânica, v. 10 (69-76).

LAM, V (1998) **Relações de similaridade genética entre espécies de palemiras com base no estudo de seus cariótipos**. Dissertação (Mestrado), Jaboticabal, São Paulo, p.95.

LORENZI, H; NOBLICK, L; KAHN, F; FERREIRA, E. (2010) **Flora Brasileira Lorenzi Arecaceae (palmeiras)**. Instituto Plantarum. Nova Odessa. 368 p.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; CERQUEIRA, L. S. C.; COSTA, J. T. M.; FERREIRA, E. (2004) **Palmeiras Brasileiras e Exóticas Cultivadas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 416p.

MIOLA, D; H. CORREIA; G.W. FERNANDES; D. NEGREIROS (2010) **Efeito do fogo na fenologia de *Syagrus glaucescens* Glaz. Ex Becc. (Arecaceae)**. *Neotropical Biology and Conservation*, 5: 146-153.

MIOLA, D. T. B; FERNANDES, G. W (2015) **Growing straight versus growing decumbent: soil quality and allometry in *Syagrus glaucescens* Becc.(Arecaceae), an endemic and threatened palm of the Espinhaço Mountains, Brazil**. *Acta Botanica Brasilica* 29: 417-424. <https://doi.org/10.1590/0102-33062015abb0030>

MIOLA, D. T. B (2011) **Efeito do fogo na fenologia de *Syagrus glaucescens* Glaz. Ex Becc.(Arecaceae)**. *Neotropical Biology & Conservation*.

NAMKOONG, G. et al. (2002) **Criteria and indicators for sustainable forest management: assessment and monitoring of genetic variation**. Forest genetic resources working paper FGR E, v. 37.

NEI, M. (1973). **Analysis of gene diversity in subdivided populations**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12), 3321-3323.

NEVES, G. F. (2021) **Caracterização de populações naturais de Licuri, *Syagrus coronata* (Mart.) Becc.(Arecaceae): Pré-melhoramento e conservação da espécie**.

NOBLICK, L. R. (2017) **A revision of the genus *Syagrus* (Arecaceae)**. *Phytotaxa*, v. 294, n. 1, p. 1-262.

NOBLICK, L. R. (1996). *Syagrus*. *The Palm Journal*, 126, 12-46.

NOBLICK, L. R. (1986) **Palmeiras das caatingas da Bahia e suas potencialidades econômicas**. In: Simpósio sobre a Caatinga e sua Exploração Racional Anais. Feira de Santana: UEFS, (99-115).

PETIT, R.J.; EL MOUSADIK, A.; PONS, O. (1998) **Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers**. Conservation biology, v. 12, n. 4, p. 844-855.

ROCHA, K. M. R. (2009) **Biologia reprodutiva da palmeira do licuri (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc.) (Arecaceae) na ecorregião do Raso da Catarina, Bahia**. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Departamento de Ciências Florestais, Universidade Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

STACHIW, R; RIBEIRO, S. B; JARDIM, M. A. G. POSSIMOSER, D; ALVVES, W. C; CAVALHEIRO, W. C. S. (2016) **Potencial de produção de biodiesel com espécies oleaginosas nativas de Rondônia, Brasil**. Acta Amazonica, v. 46, n.1, p. 81-90.

TORO, M. A.; CABALLERO, A. (2005) **Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations**. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, v. 360, n. 1459, p. 1367-1378.

VILLELA, A.A.; JACCOUD, D.B.; ROSA, L.P.; FREITAS, M.V. (2014) **Status and prospects of oil palm in the Brazilian Amazon**. Biomass Bioenergy, v. 67, p. 270-278, 2014.

YOUNG, A; BOYLE, T; BROWN, T. (1996) **The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants**. Trends in Ecology & Evolution, v. 11, n. 10, p. 413-418.

ZOLET, A. C. T et al. (2017) **Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações**.

## CAPÍTULO I

### TRANSFERIBILIDADE DE LOCOS EM *Syagrus glaucescens* Glaz. ex Becc.: SELEÇÃO DE MARCADORES SSR PARA ESTUDOS DE CONSERVAÇÃO DESTA ESPÉCIE ENDÊMICA E EM EXTINÇÃO

#### RESUMO

Palmeirinha azul (*Syagrus glaucescens* Glaz. ex Becc.) é uma palmeira da família Arecaceae, endêmica do estado de Minas Gerais. A população vem declinando a uma taxa alarmante, sendo classificada como uma espécie em extinção. Os marcadores microssatélites são largamente utilizados para o estudo de populações nativas fornecendo informações quanto a diversidade entre e dentro de populações, fluxo gênico e outros parâmetros genéticos. O presente estudo realizou uma amplificação cruzada de locos microssatélites de licuri (*S. coronata*) para *S. glaucescens* com o objetivo selecionar marcadores que permitam a geração de informações para estudos sobre a domesticação e conservação da espécie ameaçada de extinção. Ao todo, 15 pares de *primers* desenvolvidos para *S. coronata* foram testados em palmeirinha azul. Treze destes foram transferidos de uma espécie para outra, sendo 8 polimórficos entre os genótipos avaliados. Usando o gel de poliacrilamida, foi encontrada uma média de quatro alelos por loco, em uma amostra de 14 indivíduos nativos obtidos de duas localizações. Os oito locos polimórficos permitiram estimar parâmetros genéticos iniciais, tais como a heterozigose esperada média ( $H_e = 0,583$ ) e observada ( $H_o = 0,495$ ). O dendrograma obtido a partir da distância genética de Nei formou quatro agrupamentos distintos. Os resultados obtidos mostram que é possível a transferibilidade de locos microssatélites de *S. coronata* para *S. glaucescens*, constituindo como uma ferramenta promissora para análises genéticas populacionais.

**Palavras chave:** Palmeirinha azul. Espécie vulnerável. Conservação. Microssatélites.

**TRANSFERABILITY OF LOCI IN *Syagrus glaucescens* Glaz. ex Becc.: SELECTION OF SSR MARKERS FOR CONSERVATION STUDIES OF THIS ENDEMIC AND ENDANGERED SPECIES**

**ABSTRACT**

Blue palm trees (*Syagrus glaucescens* Glaz. ex Becc.) is a palm tree of the Arecaceae family, endemic to the state of Minas Gerais. The population has been declining at an alarming rate, and it is currently classified as a dying breed. Microsatellite markers are widely used for the study of native populations, providing information on diversity between and within populations, gene flow and other genetic parameters. The present study carried out a cross-amplification of licuri (*S. coronata*) loci to *S. glaucescens* with the objective of selecting microsatellite markers that allow the generation of information for studies on the domestication and conservation of the endangered species. In all, 15 pairs of primers developed for *S. coronata* were tested on blue palm. Thirteen of these were transferred from one species to another, being 8 polymorphic among the evaluated genotypes. Using the polyacrylamide gel, an average of 4 alleles per loci was found in a sample of 14 native individuals obtained from two locations. The 8 polymorphic loci allowed the estimation of initial genetic parameters, such as the average expected ( $H_e=0.583$ ) and observed ( $H_o=0.495$ ) heterozygosity. The dendrogram obtained from the genetic distance of Nei formed four distinct clusters. The results show that the transferability of microsatellite primers from *S. coronata* to *S. glaucescens* is possible, constituting a promising tool for population genetic analysis.

**Keywords:** Blue palm trees. Vulnerable species. Conservation. Microsatellites.

## 1- INTRODUÇÃO

Localizado entre três domínios vegetacionais - Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica – encontra-se os Campos Rupestres da Serra do Espinhaço de Minas Gerais. Esta ecorregião é considerada um *hotspot* da biodiversidade, abrigando inúmeras espécies endêmicas como a Palmeirinha azul, *Syagrus glaucescens*. Os indivíduos costumam apresentar forte associação direta com os afloramentos de quartzito (MIOLA, 2015). Devido às condições naturais dos campos rupestres, a palmeirinha azul apresenta resistência a seca e ao fogo, um dos maiores agentes transformadores da natureza e que exerce influência direta sobre seu padrão de distribuição (MIOLA, 2011).

As populações da palmeira estão declinando a uma taxa alarmante, restando apenas alguns indivíduos jovens, enquanto indivíduos maduros são quase que extintos. A destruição do habitat e as pressões antrópicas, como a mineração de rochas ornamentais e de revestimento, a extração ilegal para paisagismo e atividade agrícola desordenada tem sido a causa desse declínio (LEITMAN et al., 2015). Por essa conjuntura, a espécie foi considerada "Vulnerável" (VU) em avaliação realizada pela IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) (IUNC, 2009), urgindo estudos que visem sua preservação.

O conhecimento sobre a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações nativas de *S. glaucescens* é necessário para a adoção de estratégias para conservação de seu germoplasma. Os marcadores SSR são poderosas ferramentas para este tipo de estudo. Entretanto, a falta de informações na literatura e o alto custo e tempo para o desenvolvimento de *primers* para espécie torna atraente a alternativa de transferibilidade de locos entre espécies do mesmo gênero (CIPRIANI, 1999). A transferibilidade é uma consequência da homologia da sequência de DNA das regiões que flanqueiam os microssatélites.

A transferibilidade de sequências de *primers* de marcadores microssatélites é inversamente relacionada com a distância evolutiva entre as duas espécies (XIONG, 2010). A literatura mostra muitos estudos que indicam a possibilidade de usar pares de *primers* em espécies do mesmo gênero, ou até mesmo entre gêneros diferentes. O presente trabalho realizou uma amplificação cruzada entre locos das espécies *S. coronata* e *S. glaucescens*, sendo o principal objetivo selecionar marcadores microssatélites que permitam a geração de informações para a conservação e domesticação desta espécie, ameaçada de extinção.



## 2- METODOLOGIA

### 2.1- Material vegetal, obtenção do DNA e transferibilidade de marcadores (*S. coronata* para *S. glaucescens*)

As amostras de *S. glaucescens* foram coletadas em duas municipalidades mineiras (Olhos D'água e Couto de Magalhães) conforme descrito no item 3.1 da Introdução Geral. A obtenção do DNA genômico, a visualização dos alelos a partir das reações de PCR e a transferibilidade foram realizadas conforme descrito nos itens 3.2 a 3.4 da metodologia geral.

### 2.2- Análise de dados

As frequências alélicas e genótípicas para cada locus foram obtidas a partir das leituras de dados nos géis de acrilamida. Essas frequências foram submetidas ao programa R v. 4.1.0 (R CORE TEAM, 2018) usando o pacote *adegen* (JOMBART, 2018). A estrutura de variabilidade foi visualizada usando dendrogramas construídos a partir de uma matriz de distâncias genéticas de Nei (NEI, 1972) e os critérios de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*). A estabilidade dos clusters foi testada por um procedimento de reamostragem *bootstrap* a partir de 10.000 dendrogramas.

## 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 15 *primers* aqui testados foram classificados conforme a eficiência das amplificações pela PCR, a saber: 53,3% (oito pares de *primers*) amplificaram o DNA e se mostrou polimórfico entre os genótipos nos produtos de PCR; 33,3% (cinco pares de *primers*) tiveram uma amplificação sem polimorfismo e 13,4% (dois pares de *primers*) não amplificaram.

Deste modo, foram transferidos 13 locos entre as espécies e os oito polimórficos foram utilizados para um estudo genético envolvendo os acessos e *S. glaucescens* disponíveis. Todos os *primers* foram submetidos ao mesmo programa e equipamento tendo apenas o valor de temperatura de anelamento variando para cada marcador genético (Tabela 1). Os genótipos que não amplificaram satisfatoriamente foram submetidos a duas repetições de reação confirmando a inexistência de amplificação do loco testado no genótipo. A Tabela 1 apresenta as condições de amplificação utilizadas e suas respectivas amplitudes alélicas, sendo a maior alelo observado de 460 pares de bases. Os locos SYA92 e SYA124 apresentaram a maior heterozigosidade observada (0,79), e SYA129 o menor (0,0). A maior heterozigosidade esperada foi observada no loco SYA100 (0,81) e a menor no loco SYA129 (0,13).

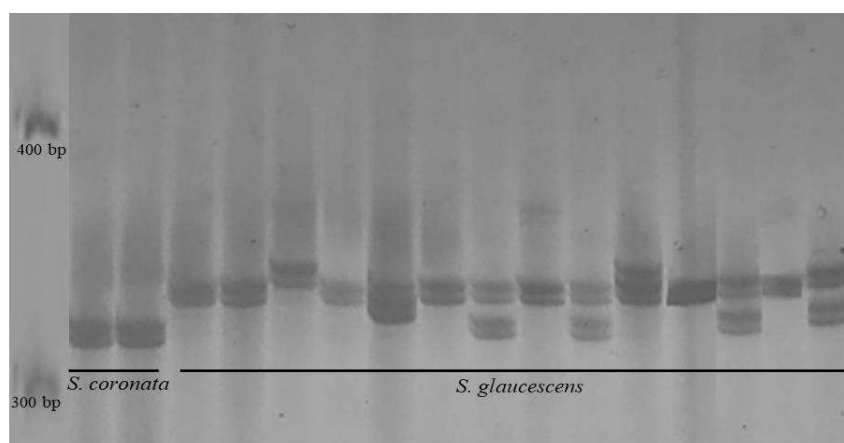
Tabela 1- Características de marcadores microssatélites de amplificação cruzada.

Locus	T <sub>a</sub> (°C)	N <sub>A</sub>	Alelo size (bp)	Ho	He	Frequency of the minor allell
<b>SYA53</b>	59	1	400	-	-	-
<b>SYA54</b>	59	4	410-430	0,29	0,72	0,2143
<b>SYA92</b>	60	5	280-300	0,79	0,73	0,2143
<b>SYA100</b>	59	7	450-460	0,57	0,81	0,1785
<b>SYA115</b>	59	2	219-239	0,36	0,5	0,4643
<b>SYA116</b>	58	6	256-274	0,64	0,73	0,2143
<b>SYA117</b>	58	3	219-226	0,5	0,4	0,1786
<b>SYA124</b>	59	4	175-186	0,79	0,65	0,3214
<b>SYA126</b>	60	1	255	-	-	-
<b>SYA129</b>	58	2	175-189	0,0	0,13	0,0714
<b>SYA131</b>	58	1	253	-	-	-
<b>SYA143</b>	59	1	279	-	-	-
<b>SYA148</b>	58	1	350	-	-	-

T<sub>a</sub>: Temperatura de anelamento; N<sub>A</sub>: Número de alelos observados; He e Ho: heterozigidade esperadas e observadas, respectivamente;

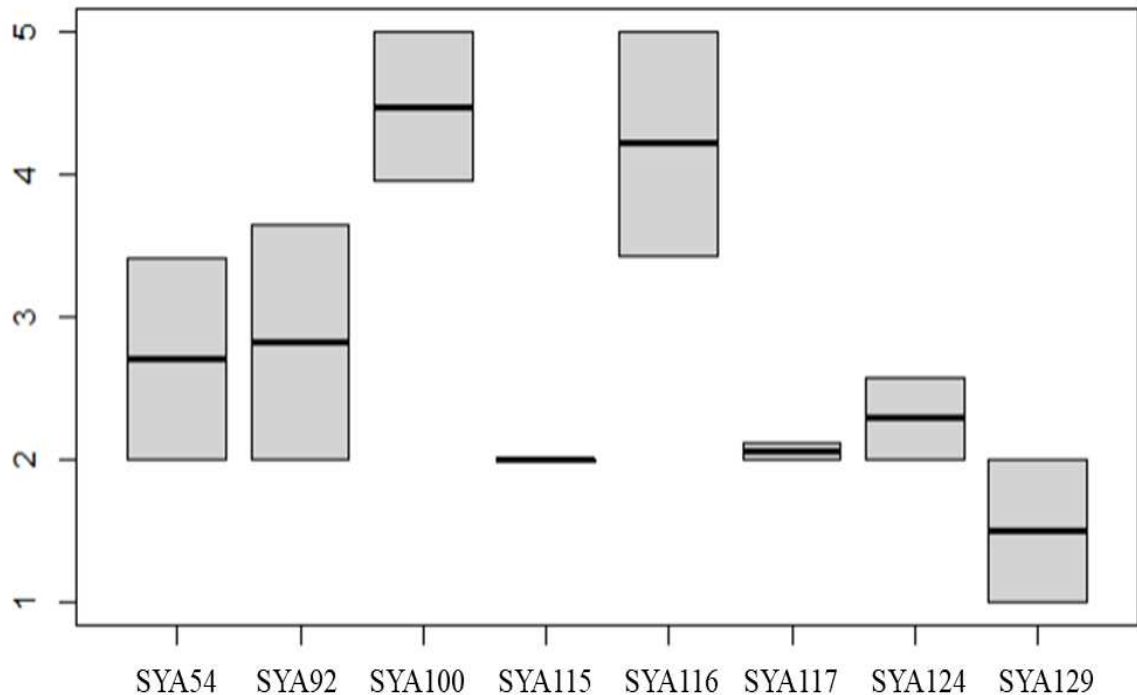
O número médio de alelos por loco polimórfico foi de 4,12 dentro dos 14 genótipos, variando de dois alelos (SYA115 e SYA129) a 7 alelos (SYA100). A Figura 1 apresenta a variabilidade alélica existente entre os genótipos avaliados utilizando o loco SYA 117. A taxa de dados perdidos foi nula nas análises.

Figura 1- Perfil de um gel de poliacrilamida 6% utilizando o primer SYA117 para 14 plantas de palmeirinha azul e 2 plantas de licuri, à esquerda está o padrão de peso molecular 1 Kb.



A Figura 2 mostra a riqueza de alelos obtidos a partir dos locos amplificados. Os locos SYA92 e SYA116 proporcionaram maior diversidade de alelo em sua região do genoma, enquanto os *primers* SYA115 e SYA117 se mostraram menos diversos.

Figura 2- Riqueza de alelos a partir dos oito *primers* SSR polimórficos



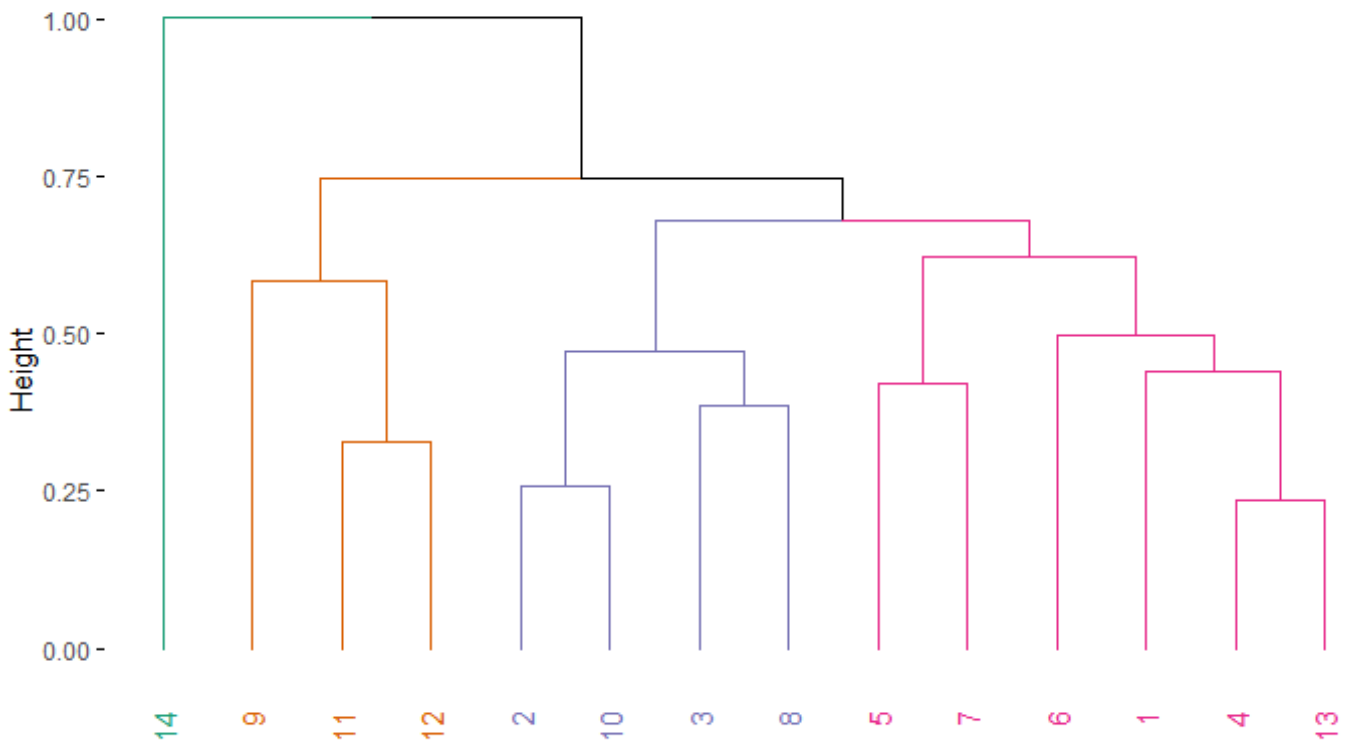
A distância dentre os indivíduos pode ser vista no dendograma (Figura 3), formado a partir da matriz de distância genética de Nei utilizando o método UPGMA. Esta análise mostra uma mistura entre acessos provenientes das duas localizações de origem, revelando uma similaridade entre eles. Miola *et al* (2015) afirma que a ocorrência desta espécie em microhabitats tão específicos, como afloramentos rochosos, seja condicionada por uma associação entre afloramentos quartzitos, altitude, declividade, estado nutricional do solo e variáveis bióticas criando microhabitats adequados para o estabelecimento da espécie endêmica.

A hibridização entre espécies do gênero *Syagrus* não é uma ocorrência incomum em habitats naturais onde algumas espécies crescem próximas, p.ex., *S. glaucescens* e *S. coronata* geram híbridos com *S. ramanzoffiana*, fato este que induz indícios quanto à similaridade entre as espécies (NOBLICK, 2019; NOBLICK, 2017; GUIMARÃES, 2014). Como se trata de uma análise prévia, estudos com maior número de genótipos e populações são necessários para se compreender melhor a distribuição da diversidade genética entre e dentro das populações. Os

marcadores microsatélites aqui testados tendem a ser eficientes em grande parte dos genótipos de *S. glaucescens*, uma vez que se trata de uma espécie com genoma mais restrito e com características bem similares a *S. coronata*.

Fig 3- Agrupamento UPGMA com base na distancia genética de Nei entre 14 genótipos de *S. glaucescens* com origem em (a) Olhos D'agua/MG : 1 a 11 (b) Couto de Magalhaes/MG : 12 a 14.

### Cluster Dendrogram



## 4- CONCLUSÃO

Os resultados indicam um potencial para a transferibilidade de locos de SSR desenvolvidos em *S. coronata* para *S. glaucescens*. O agrupamento UPGMA corrobora para a categorização de endemismo da espécie e mostram uma distância evolutiva e similaridade ancestral entre as espécies estudadas. A descoberta desses marcadores polimórficos para *S. glaucescens* proporciona a alternativa de se realizar estudos populacionais. Estes resultados tornam possíveis estudos que visem a conservação e ações de pré-melhoramento desta espécie endêmica altamente vulnerável.

## REFERÊNCIAS

- CIPRIANI, G (1999) **AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*.** Theoretical and Applied Genetics, 99:65-72. <https://doi.org/10.1007/s001220051209>.
- GUIMARÃES, C.A; VIEIRA, A. R. G (2014) **Four New Natural Hybrids of *Syagrus*.** Palms, 58(2)
- IUCN (2009) **IUCN Red List of Threatened Species.** Version 2009.1 <http://www.iucnredlist.org>. Accessed 25 October 2021.
- JOMBART, T (2018) **Package ‘adegenet’.** Github repository:< <https://github.com/thibautjombart/adegenet>.
- LEITMAN, P; SOARES, K; HENDERSON, A; NOBLICK, L; MARTINS, R. C (2015) **Arecaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- MIOLA, D. T. B; FERNANDES, G. W (2015) **Growing straight versus growing decumbent: soil quality and allometry in *Syagrus glaucescens* Becc.(Arecaceae), an endemic and threatened palm of the Espinhaço Mountains, Brazil.** Acta Botanica Brasilica 29: 417-424. <https://doi.org/10.1590/0102-33062015abb0030>
- MIOLA, D. T. B (2011) **Efeito do fogo na fenologia de *Syagrus glaucescens* Glaz. Ex Becc.(Arecaceae).** Neotropical Biology & Conservation. <https://doi.org/10.4013/nbc.2010.53.02>
- NEI M (1972) **Genetic distance between populations.** The American Naturalist, 106:283-292. <https://doi.org/10.1086/282771>
- NOBLICK, L. CENTER, M. B (2019) **Guide to the Palms of Northeastern Brazil.** <https://www.researchgate.net/publication/336364606>
- NOBLICK, L. R (2017) **A revision of the genus *Syagrus* (Arecaceae).** Phytotaxa, 294(1): 1-262 <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.294.1.1>.
- TEAM, R (2018) **Core. R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing. Austria: Vienna.
- WEIR, B. S (1996) **Genetic data analysis II** Sinauer, Sunderland. Massachusetts. <https://doi.org/10.1017/S0016672300034121>

XIONG, J (2010) **Molecular evidence for the early evolution of photosynthesis**. *Science*, 289: 1724-1730. <https://doi.org/10.1126/science.289.5485.1724>

## CAPITULO II

### DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS NATIVOS DA PALMEIRA LICURI (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc.) E ESTUDO COMPARATIVO COM A PALMEIRINHA AZUL (*Syagrus glaucescens* Glaz. ex Becc.)

#### RESUMO

*Syagrus coronata* (Mart.) Becc é conhecida como licuri e é uma das principais palmeiras oleaginosas do semiárido nordestino brasileiro. Constitui-se numa espécie nativa de grande importância ecológica e socioeconômica, possui em sua constituição valores significativos de óleo tanto na polpa quanto na amêndoa. Atualmente suas populações nativas vem sofrendo uma grande exploração extrativista, gerando perda de informação genética. Deste modo, há necessidade de se realizar pesquisa de médio e longo prazos para a espécie, e, principalmente, em relação a sua diversidade genética e estrutura populacional. O presente trabalho avaliou a diversidade genética entre acessos nativos da palmeira licuri da região norte do estado de Minas Gerais utilizando marcadores microssatélites, a fim de se compreender a variabilidade genética populacional da espécie e contribuir para ações de pré-melhoramento e conservação da palmeira. Foram utilizados 67 acessos de licuri distribuídos em quatro municípios da região norte de Minas Gerais. Quinze pares de *primers* microssatélites foram utilizados para genotipagem das amostras. As PCRs, tiveram o produto da reação revelados em acrilamida 6% corados com nitrato de prata. A partir das análises estatísticas utilizando o programa R, encontrou-se um total 124 alelos, com uma média de 5 alelos/loco. A heterozigosidade observada e esperada obtiveram um valor médio de 0,35 e 0,62, respectivamente. Foram encontrados, a partir das análises de estrutura populacional, valores de  $H_s = 0,47$  e  $D_{st} = 0,01$ . O  $F_{IS}$  da espécie estimado para todos os alelos foi de 0,30, enquanto o  $F_{ST}$  e o  $F_{IT}$ , foram de 0,02 e 0,314. Conclui-se que a escolha dos genótipos para cruzamentos futuros deve ser realizada dentro da mesma procedência, pois existe uma maior variabilidade genética dentro das populações de licuri do que entre elas. O fluxo gênico se mostrou elevado, sendo indício que os acessos nativos de licuri possuem constante movimento de genes de uma população para a outra, resultando em populações de licuri similares entre si.

**Palavras-chave:** Licuri. Endêmica. Diversidade genética. Conservação

**GENETIC DIVERSITY OF NATIVE ACCESSIONS OF THE LICURI PALM TREE  
(*Syagrus coronata* (Mart.) Becc.) AND COMPARATIVE STUDY WITH THE BLUE  
PALM TREES (*Syagrus glaucescens* Glaz. ex Becc.)**

**ABSTRACT**

*Syagrus coronata* (Mart.) Becc is known as licuri and is one of the main oil palms of the Brazilian northeastern semiarid region. It is a native species of great ecological and socioeconomic importance, with significant amounts of oil in its constitution, both in the pulp and in the kernel. Currently, its native populations have been suffering a great extractive exploitation, generating loss of genetic diversity. Thus, there is a need to conduct med- and long-term research on the species, especially in relation to genetic diversity and population structure. The present work evaluated the genetic diversity among native accessions of licuri palm in the northern region of Minas Gerais using microsatellite markers in order to understand the genetic population variability of the species and contribute to actions for pre-breeding and conservation of the palm. We used 67 accessions of licuri distributed in four municipalities in the northern region of Minas Gerais. Fifteen pairs of microsatellite primers were used for genotyping. The PCR products were revealed in 6% acrylamide stained with silver nitrate. From the statistical analyses using the R program, a total of 124 alleles were found, with an average of 5 allele/locus; the observed and expected heterozygosity were found to be of 0.35 and 0.62, respectively.  $H_s = 0.47$  and  $D_{st} = 0.01$  were found from the population structure analyses. The  $F_{IS}$  estimated for all alleles was 0.30, while the  $F_{ST}$  and  $F_{IT}$  were 0.02 and 0.314, respectively. In conclusion, the choice of genotypes for future crossings should be performed within the same population, because there is a greater genetic variability within the licuri populations than between them. The gene flow was high, indicating that the native accessions of licuri have a constant movement of genes from one population to another, resulting in populations of licuri that are similar to each other.

**Keywords:** Licuri. Endemic. Genetic diversity. Conservation

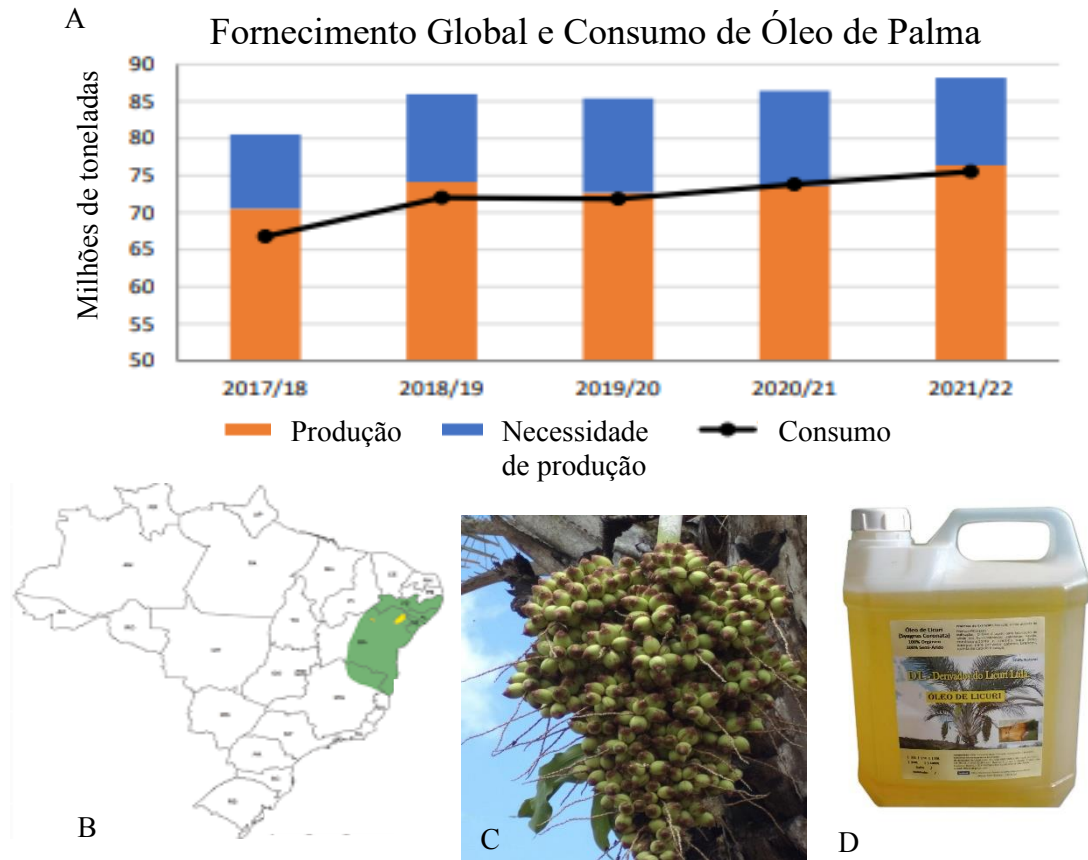


## 1- INTRODUÇÃO

A constante expansão do consumo de óleo de palma (*Elaeis guinensis* Jacq) no mundo faz com que novas espécies de potencial oleaginoso sejam buscadas e exploradas para suprir a demanda mundial – que, na atualidade, depende primariamente da palma africana – e auxiliar na economia local e nacional (Figura 1A). Dentre o grupo das oleíferas, muitas daquelas pertencentes à família das palmáceas apresentam características de grande interesse agrônomo como elevada produtividade, resiliência aos estresses ambientais, longevidade produtiva e adequabilidade fisiológica às condições tropicais (DA SILVA, 2019).

*Syagrus coronata* Mart., conhecida como licuri, é uma palmeira oleaginosa de grande importância para o bioma da Caatinga brasileira, onde tolera situações de seca prolongadas e altas temperaturas (FARIAS, 2013). De frutificação abundante, seus frutos apresentam em sua constituição valores significativos de óleo, principalmente na amêndoa, sendo uma boa produtora de óleo bruto e palmiste (Figura 1B a D) (NEVES, 2021). Por ser uma palmeira conspícua de uma região socioeconomicamente de risco, representa uma das principais fontes de sobrevivência, como alimento e matéria-prima para uso de subsistência (MAIA, 2017) Esta situação, juntamente com a fragmentação do seu bioma, contribui para a degradação constante das suas populações naturais. Neste contexto, torna-se necessária a adoção de estratégias que visem à conservação genética da espécie, pois sem variabilidade genética e estudos de interação dos genótipos com o ambiente, é impossível a obtenção de genótipos superiores por meio dos cruzamentos direcionados e seleção. O estudo da diversidade genética em populações auxilia na descrição dos níveis de variabilidade genética mantida dentro das populações e como está se encontra dividida entre e dentro das mesmas (SILVA, 2014).

Figura 1- Consumo global de óleo de palma. (A- Gráfico de produção e consumo de óleo de palma a nível mundial; B- Mapa geográfico de distribuição do licuri; C- Cacho de frutos do licuri; D- Óleo de licuri extraído para comércio.



Fonte: United States Department of Agriculture, 2021 (Adaptado)

A ocorrência de populações regionais de licuri, e em especial aquelas povoando zonas de convergência entre biomas, como as existentes no norte de Minas Gerais (transição Cerrado-Caatinga), configura uma situação de potencial riqueza genética. Uma caracterização molecular e a descrição da diversidade genética de amostras destas populações proporcionará subsídios científicos para a conservação e domesticação da espécie para o seu uso sustentável. Esta região também abriga diversas outras espécies oleaginosas do gênero *Syagrus*, muitas delas endêmicas como a *S. glaucescens* (Palmeirinha azul), e muitas resultantes de hibridização natural como: *Syagrus serroana* (*S. glaucescens* x *S. romanzoffiana*) e *Syagrus cipoensis* (*S. glaucescens* x *S. oleracea*) (NOBLICK, 2017). A palmeirinha-azul habita exclusivamente as formações quartzolíticas da Serra do Espinhaço e, como o licuri, representa um importante recurso genético para o ecossistema, como fonte de alimento e de matéria-prima para uso local (MIOLA, 2015).

Os marcadores moleculares possuem várias aplicações práticas em estudos de genética populacional e elas concentram-se em quantificar a variabilidade genética, descrever como ela se distribui nas populações e como pode ser manipulada (ROBINSON, 1998). A estrutura genética populacional refere-se à distribuição da variabilidade dentro e entre populações. A formação desta estrutura resulta de vários fatores: sistema de acasalamento, níveis de endogamia, fluxo gênico, assim como a deriva genética entre e dentro das populações (ZUCCHI, 2002).

O presente trabalho teve como objetivo obter parâmetros de diversidade genética dos acessos nativos da palmeira licuri avaliados e designar indivíduos contrastantes com base nos marcadores microssatélites para que estes possam ser utilizados em cruzamentos futuros. Adicionalmente, foram realizadas análises comparativas entre as duas palmeiras *Syagrus* do norte de Minas Gerais, licuri e palmeirinha azul, a primeira generalista da Caatinga e suas transições e a última exclusiva dos campos rupestres da Serra do Espinhaço. Os resultados aqui obtidos favorecerão a obtenção de cultivares superiores da espécie e a construção de um banco de germoplasma da palmeira licuri, além de permitir uma caracterização mais precisa de palmeirinha azul. Esta investigação pioneira permitirá a conservação da espécie e proporcionará um desenvolvimento de futuros trabalhos de melhoramento genético que possam apoiar transformação desta espécie nativa em uma cultura agrícola.

## **2- METODOLOGIA**

### **2.1 - Material vegetal, obtenção do DNA genômico e genotipagem de *S. coronata* com marcadores microssatélites.**

As amostras de licuri foram coletadas em quatro procedências mineiras (Jaíba, Capitão Enéias, Rio Pardo de Minas e Salinas) conforme descrito no item 3.1 da Metodologia Geral. A obtenção do DNA genômico, o preparo das PCRs e visualização dos alelos polimórficos foram realizadas conforme descrito nos itens 3.2 a 3.4 da Metodologia Geral.

### **2.2- Análise dos dados**

As frequências alélicas e genotípicas para cada loco foram obtidas a partir das leituras de dados nos géis de acrilamida. Essas frequências foram submetidas a um teste de adequação às proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg como definido por Weir (1996), sendo realizado

o teste de Fisher pelo método convencional de Monte Carlo, usando o programa R v. 3.5.1 (R CORE TEAM, 2018) e o pacote ‘*gap*’ (ZHAO, 2008).

A determinação das frequências alélicas, o número de alelos por loco (K), as heterozigosidades observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) foram obtidas utilizando o mesmo programa e pacote descrito anteriormente. O número efetivo de alelos por loco foi calculado através da expressão:  $A_e = 1/1(1 - H_e)$  e o valor de fluxo gênico que foi encontrado pela fórmula:  $Nm = 0,25 (1/F_{ST} - 1)$  (WRIGHT, 1951).

No cálculo das estatísticas-F ( $F_{ST}$ ,  $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$ ) e os demais parâmetros de diversidade genética, utilizou-se os pacotes R *Package* ‘*adegenet*’ (JOMBART & SOLYMOS, 2008) e ‘*hierfstat*’ (GOUDET, 2005). Através da função *df2genind* do *Package* ‘*adegenet*’, uma matriz de SSR por indivíduos, de cada procedência amostrada, foi transformada em um objeto no formato *genind*. Esse é um formato usado em R para armazenar genótipos individuais. Após esse procedimento, foi acionado o pacote ‘*hierfstat*’, no qual está implementado o algoritmo de YANG (1998), que calcula as estatísticas-F. Tanto os parâmetros de diversidade genética e as estatísticas F foram definidas sob um modelo aleatório de acordo com WEIR (1996).

A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para investigar a estruturação genética dentro das procedências analisadas. Essa análise consiste em uma transformação linear de “n” variáveis originais em “n” variáveis novas, chamadas componentes principais (CPs). Para a sua realização foram empregados os pacotes *Package* ‘*adegenet*’ e ‘*ade4*’ (CHESSEL *et al.*, 2004) com os dados moleculares obtido das análises com as plantas de licuri e palmeirinha azul (Capítulo 1).

A estrutura de variabilidade genética também foi visualizada usando dendrogramas construídos a partir de uma matriz de distâncias genéticas de Nei (NEI, 1972) e os critérios de agrupamento UPGMA (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*). Os *clusters* obtidos tiveram sua estabilidade testada por um procedimento de reamostragem com 10.000 *bootstraps*.

### 3- RESULTADOS

Dentre os 15 marcadores microssatélites obtidos de BARBOSA *et al.* (2019) (Tabela 1- Metodologia geral), o primer SYA53 não apresentou variação alélica entre os acessos estudados, enquanto o primer SYA56 não amplificou para nenhum genótipo.

### 3.1- Diversidade genética, endogamia e divergência genética populacional em *S. coronata*.

O resumo dos resultados das análises da diversidade genética para todos os acessos das diferentes localidades de *S. coronata* estão apresentados na Tabela 1. Nas análises realizadas com os 13 locos polimórficos, foram identificados 124 alelos em *S. coronata*. O número de alelos (K) por loco variou de três (SYA131 e SYA143) a oito (SYA92 e SYA100) com uma média de 5 alelos/loco. O número efetivo de alelos por loco (Ae) foi menor do que o número de alelos por loco, variando de 1,07 (SYA143) a 4,16 (SYA92) alelos, com média de 2,63 alelos/locos. A frequência do menor alelo (MAF) teve um valor médio de 0,256. Com relação aos parâmetros de diversidade genética, o loco SYA100 apresentou a maior heterozigosidade observada ( $H_o=0,68$ ) e o SYA143 a menor (0,07), sendo a média igual a 0,35. A maior heterozigosidade esperada foi verificada no loco SYA92 ( $H_e=0,76$ ) e a menor ( $H_e=0,47$ ) no loco SYA143, tendo como média 0,62. O índice de fixação ( $f$ ) por loco teve uma variação entre -0,51 a 0,83, mostrando que alguns locos são bem fixados dentro das populações enquanto outros possuem elevada taxa de heterozigotos, estando em constante processo polinização cruzada.

Tabela 1- Diversidade genética e endogamia de 13 locos microssatélites em plantas jovens de *S. coronata*.

TA:	LOCOS	T <sub>A</sub> (°C)	K	AMPLITUDE ALÉLICA (pb)	Ae	He	Ho	MAF	F
	SYA54	59	7	410-430	3,03	0,67	0,33	0,277	0,38
	SYA92	60	8	280-300	4,16	0,76	0,46	0,228	0,54
	SYA100	59	8	450-460	3,12	0,68	0,68	0,259	-0,30
	SYA115	59	4	219-239	2,22	0,55	0,20	0,142	0,65
	SYA116	58	6	256-274	3,03	0,67	0,51	0,395	-0,03
	SYA117	58	5	219-300	3,57	0,72	0,35	0,333	0,63
	SYA124	59	7	175-186	2,70	0,63	0,22	0,339	0,83
	SYA126	60	4	255-290	2,85	0,65	0,26	0,253	0,51
	SYA 127	59	4	300-320	2,44	0,59	0,48	0,265	0,09
	SYA129	58	4	175-189	2,32	0,57	0,2	0,234	0,16
	SYA131	58	3	253-260	2,38	0,58	0,52	0,259	-0,51
	SYA143	59	3	279-290	1,07	0,47	0,07	0,173	0,72
	SYA148	58	4	350-370	1,35	0,53	0,26	0,173	0,25

Temperatura de anelamento; K: Número de alelos; Ae: Número efetivo de alelo por loco; He e Ho: Heterozigose esperada e observada, respectivamente; MAF: Frequência do menor alelo; f: Índice de fixação.

Quando analisamos os loci para todas as populações, verificamos que apenas o loco SYA143 não está em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$  no Teste de Monte Carlo). A tabela 2 mostra os parâmetros de diversidade genética a partir de três localidades de estudo, sendo a procedência de Salinas-MG retirada da referida análise devido o número discrepante de indivíduos analisados dentro da procedência, sendo um valor não significativo para análise. Os índices de fixação intrapopulacional estimado em cada procedência através das heterozigosidade ( $H_o$  e  $H_e$ ) estão apresentados na Tabela 2. O valor médio foi de  $f=0,480$ , com a variação de 0,472 a 0,494. Enquanto a taxa de cruzamento aparente ( $T_a$ ) estimada teve um valor médio de 0,352.

Tabela 2- Estimativa de parâmetros genéticos de diversidade em três localidades de ocorrência natural de *S. coronata*.

População	K	He	Ho	f	Ta
Jaíba	37	0,463	0,333	0,494*	0,339
Capitão Enéias	37	0,506	0,370	0,473*	0,358
Rio Pardo de Minas	33	0,413	0,315	0,472*	0,359

K: Número de alelos por localidade; He e Ho: Valor médio por localização de heterozigose esperada e observada, respectivamente; f: Índice de fixação, Ta: Taxa de cruzamento aparente.  
\*  $P < 0,05$

### 3.2- Estrutura genética e fluxo gênico.

A estrutura genética foi examinada através das estatísticas F de WRIGHT (Tabela 3). O índice de fixação total ( $F_{IS}$ ) estimado com os treze locos de SSR (67 alelos) foi de 0,30 e os índices de fixação entre população ( $F_{ST}$ ) e total ( $F_{IT}$ ) foram de 0,02 e 0,314, respectivamente. O número de migrantes por geração ( $N_m$ ), estimado pelo valor de  $F_{ST}$ , resultou no valor de 12,25. Os parâmetros de diversidade genética mostram que existe uma maior variabilidade genética dentro das procedências analisadas ( $H_S=0,47$ ) do que entre elas ( $D_{ST}=0,01$ ). Observou-se que a diversidade genética total ( $H_T$ ), que é essencialmente a heterozigosidade esperada, quando as populações são agrupadas e de cruzamentos aleatórios, foi de 0,48. Através do teste de Mantel, foi verificada a existência de uma correlação positiva ( $Z=0,040$ ), entretanto não significativa, entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas dos indivíduos amostrados.

Tabela 3- Distribuição da diversidade genética de 67 acessos de *S. coronata* do norte de Minas Gerais.

População	N	H <sub>T</sub>	H <sub>s</sub>	D <sub>ST</sub>	F <sub>IS</sub>	F <sub>ST</sub>	F <sub>IT</sub>	N <sub>M</sub>	Z
Total	67	0,48	0,47	0,01	0,30	0,02	0,314	12,25	0,040**

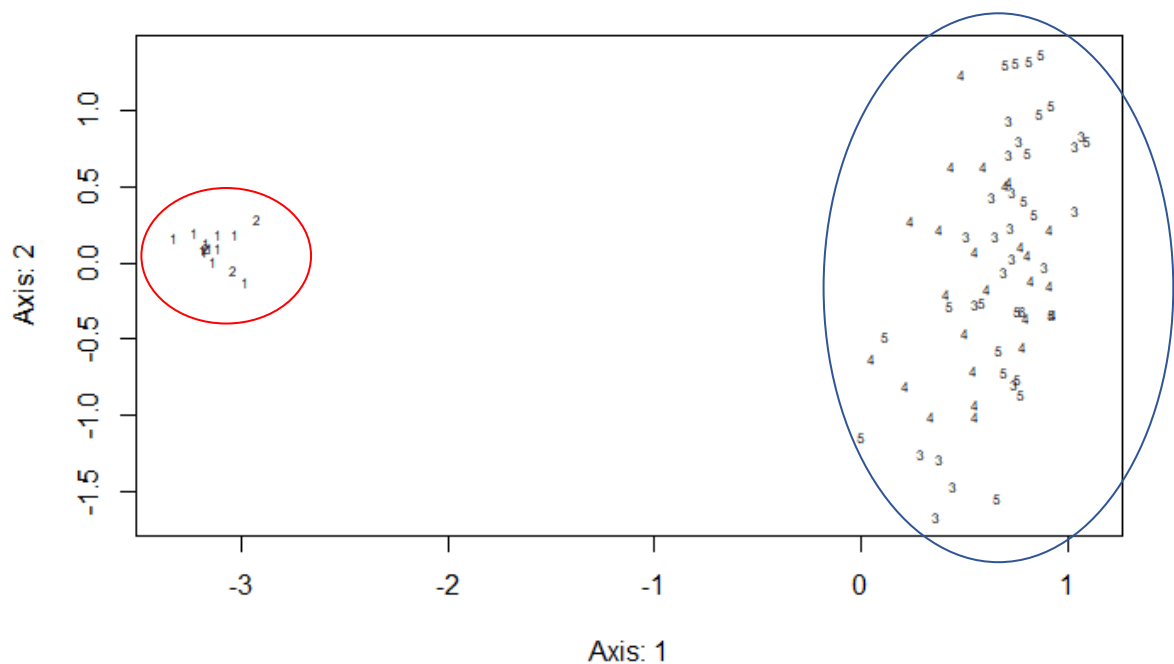
N: número de indivíduos; H<sub>T</sub>: Heterozigosidade total; H<sub>s</sub>: Heterozigosidade dentro das populações; D<sub>ST</sub>: Diversidade entre as populações; F<sub>IS</sub>: Índice de fixação dentro; F<sub>ST</sub>: Índice de fixação entre as populações; F<sub>IT</sub>: Índice de fixação total; N<sub>m</sub>: Fluxo gênico; Z: Correlação de Mantel entre as matrizes de distância genética (Nei) e matriz geográfica (Euclidiana)

\*\*P>0,05

### 3.3- Agrupamento de componentes principais (PCA) a partir dos dados moleculares

Os dados moleculares utilizados nas análises de PCA para visualização do padrão geral de diferenciação populacional evidenciaram um distanciamento nítido entre as plantas de *S. coronata* e *S. glaucescens* (Figura 2), formando dois grupos distintos no gráfico. O grupo menor evidencia as plantas de *S. glaucescens* procedentes de dois municípios (1- Olhos D'água; 2- Couto de Magalhães). O grupo maior envolve todas as plantas de *S. coronata*, das quatro áreas de coleta distintas (3- Jaíba; 4- Capitão Enéias; 5- Rio Pardo de Minas; 6- Salinas).

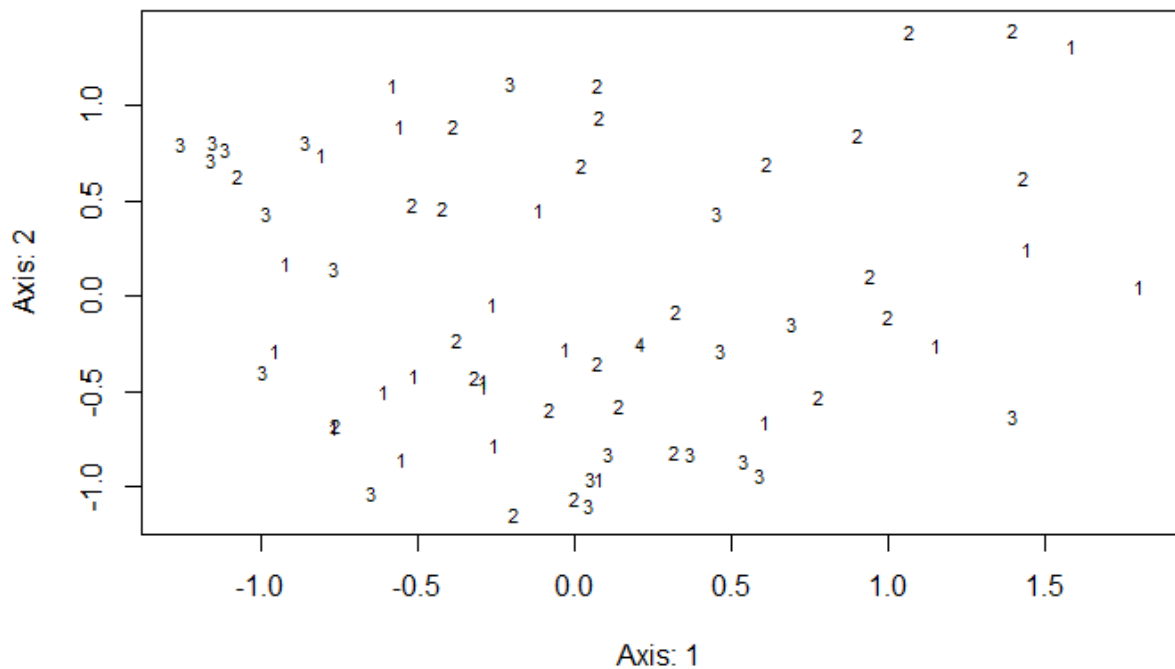
Figura 2- Análise de Componentes Principais na matriz de genótipos de *S. glaucescens* e *S. coronata*, coletados no norte de Minas Gerais. Indivíduos de mesma procedência estão representados pelo mesmo número. *S. glaucescens* (1- Olhos D'água; 2- Couto de Magalhães); *S. coronata* (3- Jaíba; 4- Capitão Enéias; 5- Rio Pardo de Minas; 6- Salinas). Axis 1: Primeiro componente principal; Axis 2: Segundo componente principal.



O gráfico de dispersão gerado a partir dos CP apenas com as plantas de *S. coronata* (Figura 3) apresentou elevada variabilidade genética entre os acessos, não tendo uma formação de agrupamento das amostras a partir das suas localidades de origem. Portanto, não sendo possível a formação de grupos de similaridade.

Este resultado mostra que os genótipos coletados em uma procedência podem ser encontrados também nas demais localizações. Esta informação corrobora com o valor baixo de  $F_{ST} = 0,02$  encontrado neste trabalho, que mostra a baixa diversidade genética entre as populações estudadas, ao mesmo tempo que confirma o elevado fluxo gênico ( $Nm = 12,25$ ) encontrado.

Figura 3- Análise de Componentes Principais na matriz de genótipos de *S. coronata*. Indivíduos de mesma procedência estão representados pelo mesmo número (1- Jaíba; 2- Capitão Enéias; 3- Rio Pardo de Minas; 4- Salinas). Axis 1: Primeiro componente principal; Axis 2: Segundo componente principal.



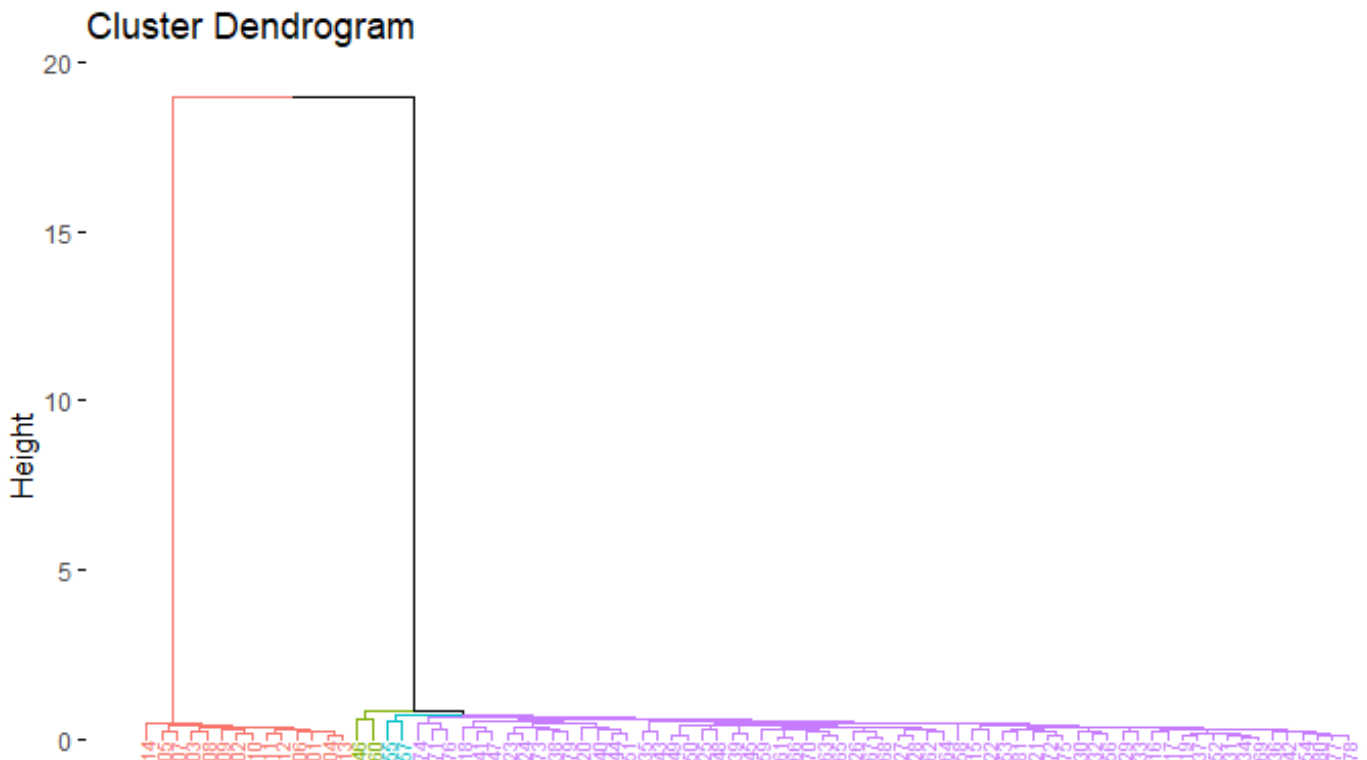
### 3.4- Agrupamento UPGMA

Os dendrogramas baseados nas distâncias genéticas de Nei (1972) agrupadas pelo método de UPGMA estão apresentados nas Figuras 4 e 5. É observado o mesmo padrão dos agrupamentos dos acessos demonstrado na PCA, tanto para as análises com as duas espécies do gênero *Syagrus*, quanto para análise individual apenas com *S. coronata*. Assim, a figura 4 mostra de forma clara a separação entre dois grupos: do licuri - grupo da linha preta, que



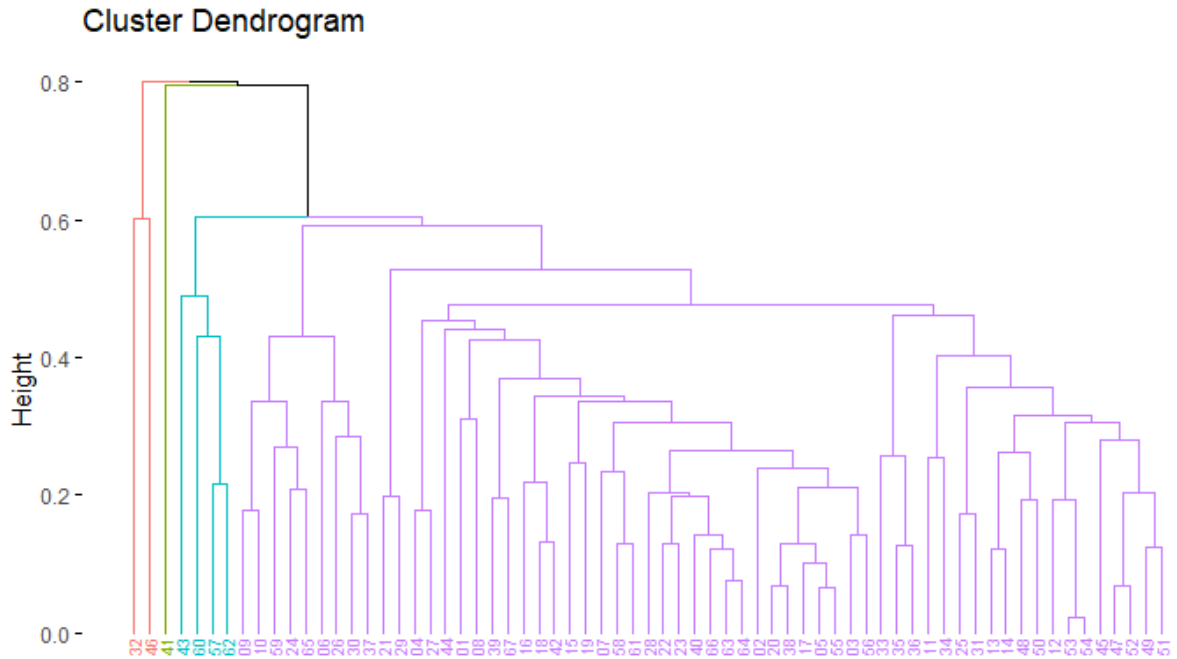
agregou todos os 67 genótipos de *S. coronata*, independente da procedência; e da palmeirinha azul - grupo da linha vermelha, que congregou todos os 14 genótipos de *S. glaucescens*.

Figura 4- Padrão de estruturação genética entre 4 procedências de *S. coronata* e 2 procedências de *S. glaucescens*, definido pelo agrupamento UPGMA, com base nas distâncias genéticas de Nei (1978).



O dendrograma referente às populações de *S. coronata* (Verde, Azul e Lilás) foi obtido a partir de uma nova análise com dados referentes apenas a espécie (Figura 5). O resultado mostra a formação de 4 grupos: A amostra 41 (Verde), oriunda da cidade de Capitão Enéias, mostra-se diferente geneticamente dos demais acessos de licuri, não formando grupo com outra matriz. Os acessos 43, 57, 60 e 62 (Azul) são mais semelhantes e formam um grupo geneticamente diferente, assim como 32 e 46 (vermelho) mostrando uma similaridade genética entre eles. Plantas de: Jaíba, Capitão Enéias, Rio Pardo de Minas e Salinas formaram um grupo único (Lilás), sem muita diferença genética entre eles. Fortalecendo mais uma vez a baixa variabilidade genética entre as procedências estudadas.

Figura 5- Padrão de estruturação genética entre 4 procedências de licuri (Jaíba- 1 a 21; Capitão Enéias- 22 a 46; Rio Pardo de Minas: 47 a 66; Salinas: 67), definido pelo agrupamento UPGMA, com base nas distancias genéticas de Nei (1978).



#### 4- DISCUSSÃO

O conhecimento da distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações nativas de *S. coronata* é essencial para a adoção de estratégias eficientes para construção do seu germoplasma e em condições *ex situ* e *in situ*. Além de trazer informações importantes sobre sua estrutura populacional, contribuindo para ações de domesticação e pré-melhoramento da espécie. Os marcadores microssatélites constituem uma poderosa ferramenta para este tipo de estudo.

Os locos SYA53 e SYA56 não apresentaram variação alélica e nem amplificaram, respectivamente, a partir das amostras oriundas da região norte de Minas Gerais. BARBOSA *et al.* (2019), a partir da realização do sequenciamento de alto rendimento de acessos nativos de *S. coronata* presentes nos estados da Bahia, Pernambuco, Alagoas e Sergipe, desenvolveu 30 locos de microssatélites no qual: três não amplificaram, doze foram monomórficos e 15 polimórficos, sendo estes utilizados para o desenvolvimento deste trabalho. Esta variação entre a área de estudo do desenvolvimento dos marcadores SSR e das amostras analisadas nesta pesquisa pode ser um fator para não efetividade dos *primers*, mostrando uma variação das regiões flangeadoras das palmeiras licuri das diferentes localidades.

Em relação à diversidade genética, observou-se no presente trabalho um nível relativamente baixo de multialelismo ( $K_{\text{MÉDIO}} = 5$  alelos/loco) em todos os treze locos polimórficos. Estudos já realizados com outras populações de *S. coronata* encontram valores superiores: SIMPLICIO (2018)  $K_{\text{MÉDIO}} = 9,8$ ; BARBOSA (2019)  $K_{\text{MÉDIO}} = 11$ . É similar ao encontrado por RIBEIRO et al. (2010) e KONAN et al. (2007) de 5,2 e 4,83 alelos/loco em coco (*Cocos nucifera* L.). Este parâmetro é fundamental para a escolha de populações que irão participar de programas de conservação ou melhoramento futuros, pois quanto maior o número de alelos presentes em uma população, maior é a sua diversidade (PETIT *et al.*, 1998). Entretanto, esta estimativa é fortemente influenciada pela quantidade de indivíduos presentes nas amostras, tendendo a aumentar quanto maior for o tamanho amostral.

A variação ampla da heterozigosidade observada por locos ( $H_o$  - 0,07 a 0,68) mostra que alguns possuem auto-nível de homozigotos, podendo ser uma limitação a capacidade de responder e adaptar-se. Além disso, a frequência de heterozigotos tende a ser maior com o aumento da diversidade genética. Já a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) por locos variou de 0,47-0,76 a partir das frequências alélicas encontradas nas amostras, partindo do pressuposto de que a população esteja em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Populações nativas de licuri da região litoral do Nordeste apresentam uma variação de  $H_o$  por loco bem similar a este estudo (0,06 a 0,63), e uma  $H_e$  superior (0,73 a 0,88). Já populações nativas de licuri do estado da Bahia obtiveram um índice alto de  $H_o$  (0,785 a 1,000) (SIMPLICIO, 2018; BARBOSA, 2019). O licuri ocupa toda a porção central e oriental do estado da Bahia, sendo este estado considerado o de maior ocorrência e o centro de distribuição do licuri (DRUMOND, 2007). Desta forma, a comparação dessas informações leva a crer que os maiores índices de diversidade genética são encontrados em amostras procedentes do estado da Bahia, como encontrado por SIMPLICIO (2018). LAINDORF *et al.* (2018), trabalhando com palmeiras *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman, que é descrita como uma espécie que gera híbridos naturais com *S. coronata* (SOARES *et al.*, 2017), encontraram  $H_o$  médio (0,17), e a  $H_e$  médio (0,75), sendo valores inferiores ao deste trabalho.

A frequência do menor alelo (MAF) fornece informações para diferenciar variantes comuns e raras na população. Sidore (2015) classificou as variantes encontradas no seu estudo de acordo com seu MAF. Comparando-se as variantes raras ( $\text{MAF} < 0,05$ ) e as variantes comuns ( $\text{MAF} > 0,05$ ), observou-se, neste trabalho, que todas variantes foram comuns (0,395), valor inferior ao encontrado para *Phoenix dactylifera* L. (Arecaceae) (0,51) (MOUSSOUNI, 2017).

O índice de fixação teve uma grande variação entre os locos avaliados, com uma média de 0,301, sendo significativo ( $P > 0,05$ ) em grande parte dos conjuntos amostrais. Apesar de não ser tão elevada, os resultados mostram que alguns locos são mais fixados que outros dentro dessas populações. Pesquisas com a palmeira macaúba (*Acrocomia aculeata*), apresentam um  $f$  por loco com média inferior, de 0,57 (MENGISTU, 2015).

Quando analisamos os acessos nativos da palmeira licuri a partir da sua área de coleta encontramos que os parâmetros de diversidade genética e índice de fixação são muito semelhantes, e não diferiram estatisticamente entre si para as três localizações, como pode ser visualizada na Tabela 2. O  $f$  intrapopulacional continuou sendo mediano e significativo nos três conjuntos amostrais, mostrando que provavelmente existe um déficit de heterozigotos devido características reprodutivas da espécie, como a possibilidade de autofecundação. A taxa de fecundação cruzada aparente encontrada foi inferior ao descrito para palmeira juçara (*Euterpe edulis* MART.) – 0,855 (GAIOTTO, 2001). Mesmo não sendo um valor elevado, evidencia a ocorrência de troca de informação genética entre os acessos.

A estrutura populacional obtida através das estatísticas  $F$  de Wright, resultou em índice de fixação total ( $F = 0,30$ ), mostrando que as plantas dentro das suas populações estão em processo de troca de informações genéticas. O nível baixo de endogamia apontado para planta *S. coronata* deve ocorrer por cruzamento entre parentes, deriva genética, segregação de alelos nulos ou autofecundação como sugere SOUZA (2002). Rocha (2009) concluiu que *S. coronata* apresenta sistema reprodutivo misto devido à ocorrência de polinização cruzada e possibilidade de autofecundação decorrente da sincronia entre as fenofases masculina e feminina em uma mesma planta.

Ademais, as estatísticas  $F$  indicaram que, no geral, os acessos nativos da palmeira licuri estudados não formam subgrupos que correspondam aos seus respectivos municípios de coleta, e que existe diversidade maior dentro das populações do que entre já que o valor de diversidade entre as populações,  $F_{ST}$ , foi inferior ao  $F_{IS}$ . Resultados de  $F_{ST} = 0$  indicam que as populações têm frequências de alelos idênticas e  $F_{ST} = 1$  indicam que as populações fixaram alelos diferentes. O valor encontrado neste trabalho de  $F_{ST}$  para todos os locos foi de 0,02, podendo ser interpretado como baixa diferenciação genética. WRIGHT (1969) afirma que valores de  $F_{ST}$  de 0,00 a 0,05 indicam baixa diferenciação genética, de 0,05 a 0,15 indicam média diferenciação genética e valores de 0,15 a 0,25 indicam alta diferenciação genética. Entretanto, devemos ainda considerar que, apesar de amplamente utilizado, o índice de  $F_{ST}$  pode sofrer variação em análises de dados de microssatélites. Dentre os motivos, cita-se a existência de

diversos alelos e provavelmente qualquer coleta não amostraria de forma efetiva toda amplitude da diversidade. Valores semelhantes, de maior diversidade dentro das populações do que entre as populações, também foram encontrados para outras espécies: *S. romanzoffiana* ( $F_{IS} = 0,925$  e  $F_{ST} = 0,110$ ); *Syagrus oleracea* ( $F_{IS} = 0,603$  e  $F_{ST} = 0,091$ ); *E. edulis* ( $F_{IS} = 0,117$  e  $F_{ST} = 0,061$ ) (SANTOS *et al.*, 2020; LINDORF *et al.*, 2018; GAIOTTO, 2001).

A estimativa do valor de indivíduos migrantes entre as procedências por geração ( $Nm = 12,25$ ) foi extremamente alto, indicando uma taxa de migrantes entre as populações de extrema grandeza, diminuindo assim o processo de diferenciação e de isolamento por distâncias. Segundo Wright (1951), quando  $Nm \geq 1,0$ , ou seja, quando um indivíduo ou mais indivíduos migram por geração, os efeitos da migração são suficientes para contrapor os efeitos da deriva e, portanto, o número de migrantes por geração impede a divergência entre populações. Este valor pode ser considerado como indício que os acessos nativos de licuri se encontram em um constante processo de diferenciação nas procedências analisadas. *S. coronata* é uma fonte constante de alimento para algumas espécies de aves como araras, tendo suas sementes dispersadas por muitos quilômetros de distância (DA ROCHA, 2009), proporcionando fluxo gênico grande entre regiões distantes; ademais, as procedências aqui estudadas são de uma mesma região rural, tendo uma proximidade significativa entre elas e, portanto, sujeitas à ação humana. Fluxo gênico alto também é encontrado em outras palmeiras, como a juçara, *E. edulis* ( $Nm = 10,07$ ) (REIS, 1996).

As análises de agrupamento utilizando os métodos de PCA e UPGMA trouxeram informações similares entre si. Inicialmente o resultado das análises com as duas espécies do gênero *Syagrus* estudadas nesta dissertação, evidenciou de forma clara o distanciamento genético existente entre as duas. Apesar de serem membros da mesma família, suas particularidades fenotípicas e de desenvolvimento levaram a uma classificação taxonômica diferente para cada espécie. De fato, não se foi reportado nenhum híbrido entre as duas espécies estudadas, embora ambas façam híbridos com espécies como *S. romanzoffiana* (NOBLICK, 2017). Na medida em que os processos de evolução e especiação por seleção natural ocorrem de forma variável em cada local, a distribuição espacial da diversidade genética segue padrões geográficos (WRIGHT, 1931). Além de compartilhar regiões comuns em seus genomas, as espécies *S. coronata* e *S. glaucescens* apresentam características fenotípicas muito similares entre si, esses fatos induzem que os indivíduos se relacionam na descendência deles, que vem de um ancestral em comum.

As análises envolvendo apenas os indivíduos nativos da palmeira *S. coronata*, mostrou a formação de quatro grupos distintos, tendo a formação de três grupos por plantas procedentes da cidade de Capitão Enéias e Rio Pardo de Minas, sendo: dois grupos pequenos, compostos pelas matrizes (32 e 36), (43, 57, 60 e 62) e o acesso 41 que agrupando-se de forma isolada. Portanto, este último acesso mostrou-se geneticamente diferente de todos os acessos analisados, e propenso para uso em cruzamentos que visem a obtenção de plantas superiores, por apresentar uma variabilidade genética diferente dos demais. O quarto grupo formado foi composto por plantas oriundas de todas as localizações de estudo

O resultado observado no dendrograma não sugere a existência de estruturação genética espacial na população, visto que os acessos procedentes de palmeiras próximas tendem a apresentar maior distância entre si do que de palmeiras distantes. Em termos de melhoramento, isto implica que a seleção deveria procurar manter acessos oriundos do mesmo grupo, dado que estes serão teoricamente mais divergentes. Em contrapartida, a seleção deve priorizar progênies mais divergentes a fim de procurar explorar a heterose, ou vigor de híbrido. Tendo em vista que o dendrograma foi construído com base em marcadores microssatélites herança supostamente neutra, não é possível garantir que os cruzamentos de indivíduos, localizados no grupo, expressarão heterose.

Este resultado ratifica os parâmetros de estrutura populacional encontrados neste trabalho. Isso é condizente com o estudo de Neves (2021), que a partir dos caracteres produtivos e vegetativos de acessos nativos de licuri, das mesmas localizações deste estudo, não visualizou um agrupamento de indivíduos oriundos das mesmas localidades. Os resultados fortalecem mais uma vez a variabilidade genética da população, particularmente no âmbito intrapopulacional.

## **5- CONCLUSÃO**

Os marcadores microssatélites foram ferramentas eficientes para determinação dos parâmetros de diversidade genética, e estrutura populacional das palmeiras nativas de licuri da região norte de Minas Gerais. Os parâmetros de diversidade genética e estrutura populacional mostraram que as plantas de licuri estão em um constante processo de diferenciação intrapopulacional. A variabilidade genética intrapopulacional encontrada é maior do que entre as populações estudadas, sendo um reflexo do fluxo gênico elevado encontrado entre as populações, que acarreta a redução do processo de diferenciação das populações e de isolamento por distância.

Os resultados dos agrupamentos por PCA e UPGMA reforçam essa similaridade entre as populações estudadas e ao mesmo tempo comprova a elevada distância entre as amostras de licuri e a palmeirinha azul. O acesso 41 de *S. coronata*, oriundo da cidade de Capitão Enéias, se mostrou geneticamente diferente dos demais.

Diante a devastação das palmeiras de licuri causada pela demanda humana, produção de alimentos e recursos, a efetiva conservação das espécies nativas é de extrema importância. Os resultados obtidos mostram uma urgência para adoção de estratégias de conservação *ex situ*, uma vez que as populações nativas são constantemente degradadas. A coleta de amostras dentro das populações deve ser alta devido à grande variabilidade genética encontrada dentro das populações.

Análises com tamanho populacional maior e com amostras provenientes de áreas mais distantes e de diferentes regiões de ocorrência natural podem fornecer informações mais precisas sobre a estrutura populacional da palmeira licuri.

## 6- CONCLUSÃO GERAL

O estudo de transferibilidade de locos entre as espécies *S. coronata* e *S. glaucescens* se mostrou efetivo e mostrou que existe potencial de transferibilidade de pares de *primers* microsatélites para o mesmo gênero. Dentre os locos testados, oito se mostraram polimórficos. Este estudo foi de extrema importância e descreve *primers* funcionais para palmeirinha azul, informação que ainda era inexistente na literatura. Os marcadores moleculares polimórficos aqui descritos, permitiram estudos populacionais e de diversidade genética para pesquisas futuras com esta espécie endêmica e ameaçada de extinção.

Os acessos nativos da palmeira licuri apresentaram elevado grau diversidade genética que se mostrou distribuída principalmente dentro das populações, mostrando uma grande variabilidade genética em distâncias relativamente pequenas no norte de Minas Gerais, o que evidencia a necessidade de conservação da espécie. O fluxo gênico alto e a proximidade entre os municípios de coleta das amostras contribuíram diretamente para obtenção de uma baixa variabilidade genética entre as populações. Fato este que pode ser visualizado pelos agrupamentos de PCA e UPGMA.

As informações moleculares aqui obtidas corroboram com estudos anteriores de diversidade genética baseados em caracteres produtivos e vegetativos de licuri das mesmas procedências.

Estimar a diversidade genética de espécies ameaçadas e constantemente exploradas é de extrema importância no sentido da conservação e manejo sustentado. Para evitar a extinção de

espécies importantes tanto ecologicamente tanto para o próprio ser humano, estratégias de conservação devem ser delineadas. A adoção de práticas para conservação *ex situ* neste trabalho se mostra fundamental, para manter amostras representativas das populações, sendo necessário um número alto de coletas dentro das populações para as espécies estudadas.

Sendo assim, as informações obtidas neste trabalho podem servir para subsidiar a maneira de extrativismo da espécie e para estudos genéticos populacionais futuros, contribuindo para a sua conservação.



## REFERÊNCIAS

- BARBOSA, S. N.; ALMEIDA, C. (2019). **Genome survey and development of 15 microsatellite molecular markers in *Syagrus coronata* (Martius) Beccari (Arecaceae) by next-generation sequencing.** *Brazilian Journal of Botany*, 42(1), 195-200.
- CHESEL, Daniel et al. The ade4 package-I-One-table methods. **R news**, v. 4, n. 1, p. 5-10, 2004.
- DA SILVA, A. J. B. (2019) **Característica de alguns frutos das palmeiras nativas da Amazônia Brasileira.** Meio Ambiente, Sustentabilidade e Tecnologia–Volume 3, 18.
- DRUMOND, M. A. (2007). **Licuri *Syagrus coronata* (Mart.) Becc.** Embrapa Semiárido- Documentos (INFOTECA-E).
- FARIAS, C. M. D. M. (2013). **Produção e caracterização de lípases de *Aspergillus* da Micoteca URM utilizando resíduo de Licuri (*Syagrus coronata*) (Martius) Beccari como substrato** (Master's thesis, Universidade Federal de Pernambuco).
- GAIOTTO, F. A., BRONDANI, R. P. V., & GRATTAPAGLIA, D. (2001). **Microsatellite markers for heart of palm–*Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart.(Arecaceae).** *Molecular Ecology Notes*, 1(1-2), 86-88.
- HU, Y.; WANG, L.; XIE, X.; YANG, J.; LI, Y.; ZHANG H. **Genetic diversity of wild populations of *Rheum tanguticum* endemic to China as revealed by ISSR analysis.** *Biochemical Systematics and Ecology* 38(3): 264-274, 2010.
- SIMPLICIO, R. R., PEREIRA, D. G., & WALDSCHMIDT, A. M. (2017). **Transferability of microsatellite markers in *Syagrus coronata* (Mart.) Becc.(Arecaceae), an iconic palm tree from the Brazilian semiarid region.** *Genet Mol Res*, 16(10.4238).
- GOUDET, J. (2005). **Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics.** *Molecular Ecology Notes*, 5(1), 184-186.
- JOMBART, T. (2008). **ade4: a R package for the multivariate analysis of genetic markers.** *Bioinformatics*, 24(11), 1403-1405.
- KONAN, K. J. N. L., KOFFI, K. E., KONAN, J. L. S., LEBRUN, P., DERY, S. K., & SANGARE, A. (2007). **Microsatellite gene diversity in coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions resistant to lethal yellowing disease.** *African Journal of Biotechnology*, 6(4).
- LAINDORF, B. L., DE FREITAS, K. E., LUCINI, F., STEFENON, V. M., KÜSTER, M. C., SCHÜNEMANN, A. L., ... & PEREIRA, A. B. (2018). **Genetic Diversity and Structure of *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman (Arecaceae) in Southern Brazil.** *Tropical Conservation Science*, 11, 1940082918798330.
- MAIA, J. M., DE OLIVEIRA SOUSA, V. F., DE LIRA, E. H. A., & DE LUCENA, A. M. A. (2017). **Motivações socioeconômicas para a conservação e exploração sustentável do bioma Caatinga.** *Desenvolvimento e meio ambiente*, 41.
- MENGISTU, F. G. (2015). **Cross-species amplification of microsatellite markers and genetic diversity in the macaw palm (*Acrocomia aculeata*).**

MIOLA, D. T. B; FERNANDES, G. W (2015) **Growing straight versus growing decumbent: soil quality and allometry in *Syagrus glaucescens* Becc.(Arecaceae), an endemic and threatened palm of the Espinhaço Mountains, Brazil.** Acta Botanica Brasilica 29: 417-424. <https://doi.org/10.1590/0102-33062015abb0030>

MOUSSOUNI, S., PINTAUD, J. C., VIGOUROUX, Y., & BOUGUEDOURA, N. (2017). **Diversity of Algerian oases date palm (*Phoenix dactylifera* L., Arecaceae): Heterozygote excess and cryptic structure suggest farmer management had a major impact on diversity.** PloS one, 12(4), e0175232.

NEI M (1972) **Genetic distance between populations.** The American Naturalist, 106:283-292. <https://doi.org/10.1086/282771>

NEVES, G. F. (2021) **Caracterização de populações naturais de Licuri, *Syagrus coronata* (Mart.) Becc.(Arecaceae): Pré-melhoramento e conservação da espécie.**

NOBLICK, Larry R. **A revision of the genus *Syagrus* (Arecaceae).** Phytotaxa, v. 294, n. 1, p. 1-262, 2017.

PETIT, R. J., EL MOUSADIK, A., & PONS, O. (1998). **Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers.** *Conservation biology*, 12(4), 844-855.

Reis, M. S. D. (1996). **Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmitero (*Euterpe edulis* Martius)** (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

ROBINSON, I. P (1998) Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ACELINO, A. C (Ed.) **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos.** Viçosa: UFV.p. 329-380.

ROCHA, K. D. (2009). **Biologia reprodutiva da palmeira licuri (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc.)(Arecaceae) na ecorregião do raso da Catarina, Bahia.** *Universidade Federal Rural de Pernambuco.*

SANTOS, S. K. S., ORTEGA, J. R., ROCHA, G. P., DE MELO, A. F., DE OLIVEIRA, D. A., BRANDÃO, M. M., ... & MENEZES, E. V. (2020). **Transferibilidade de marcadores SSR, diversidade e estrutura genética em *Syagrus oleracea*.** Brazilian Journal of Development, 6(8), 59931-59947.

SILVA, D. P. D. (2014). **Variabilidade e diversidade genética de populações de *Ocotea notata* (Nees & Mart.) Mez (Lauraceae).**

RIBEIRO, F. E., BAUDOUIN, L., LEBRUN, P., CHAVES, L. J., BRONDANI, C., ZUCCHI, M. I., & VENCOVSKY, R. (2010). **Population structures of Brazilian tall coconut (*Cocos nucifera* L.) by microsatellite markers.** *Genetics and Molecular Biology*, 33(4), 696-702.

SOARES, K. P., DE ASSIS, L. C., GUIMARÃES, C. A., & VIEIRA, A. R. G. (2014). **Four new natural hybrids of *Syagrus* from Brazil.** *Palms*, 58(2), 87-100.

TEAM, R (2018) **Core. R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing. Austria: Vienna.

- WEIR, B.S. 1996. **Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data**. Sinauer Assoc., Inc.: Sunderland, MA, USA.
- WRIGHT, S. T. C., & HIRON, R. W. P. (1969). **(+)-Abscisic acid, the growth inhibitor induced in detached wheat leaves by a period of wilting**. *Nature*, 224(5220), 719-720.
- WRIGHT, S. (1951) **The genetical structure of populations**. *Ann Eugen*, **15**, 323–354.
- WRIGHT, S. (1931). **Evolution in Mendelian populations**. *Genetics*, 16(2), 97.
- YANG RC. **Estimating hierarchical f statistics**. *Evolution*. 1998; 52(4): 950–956. pmid:28565205
- ZHAO, J. H. (2008). gap: **Genetic analysis package**. *Journal of Statistical Software*, 23, 1-18.
- ZUCCHI, Maria Imaculada. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.