

LUIZ CLÁUDIO COSTA SILVA

**ESTRUTURA GENÉTICA E FILOGEOGRAFIA MOLECULAR
DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Acrocomia aculeata* NOS
ESTADOS DE MINAS GERAIS E SÃO PAULO**

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*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586e
2013

Silva, Luiz Cláudio Costa, 1987-

Estrutura genética e filogeografia molecular de populações naturais de *Acrocomia aculeata* nos estados de Minas Gerais e São Paulo / Luiz Cláudio Costa Silva. – Viçosa, MG, 2013. vi, 40 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maurilio Alves Moreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 33-40.

1. Filogeografia. 2. Diversidade genética. 3. Macaúba. 4. *Acrocomia aculeata*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 576.8809

LUIZ CLÁUDIO COSTA SILVA

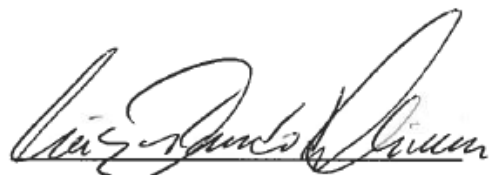
**ESTRUTURA GENÉTICA E FILOGEOGRAFIA MOLECULAR DE
POPULAÇÕES NATURAIS DE *Acrocomia aculeata* NOS ESTADOS DE
MINAS GERAIS E SÃO PAULO**

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: 15 de Março de 2013.



Dr. Newton Deniz Piovesan



Prof. Luiz Orlando de Oliveira
(Coorientador)



Prof. Maurílio Alves Moreira
(Orientador)

“We're half way there,
Livin' on a prayer.
Take my hand, we'll make it, I swear”

“It's too late, tonight,
To drag the past out into the light.
We're one, but we're not the same,
We get to carry each other.”

“I'll find my way
Through night and day,
'Cause I know I just can't stay
Here in Heaven.”

*Aos meus pais Maria Eugênia e Francisco (in memorian),
Aos meus irmãos Tônico, José Roberto, Rubinho e Flavinho,
Às minhas irmãs Roberta e Ana Paula,*

Dedico!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado uma família abençoada, e por ter estado à minha frente e me guiado para todas as realizações que tenho alcançado em minha vida.

À minha mãe Maria Eugênia, pelo altruísmo, pela educação e confiança, e pelo amor incondicional que cultivou manteve nossa família sempre unida.

Ao meu Pai Francisco (*in memoriam*), pelo amor recebido, e pelo exemplo de força e caráter, como pai e homem, mesmo no pouco tempo que convivemos.

Aos meus irmãos Tunico, Zé Roberto, Rubinho, Roberta, Flavinho e Ana Paula, pelo amor, companheirismo, paciência e apoio na minha jornada acadêmica.

Aos meus cunhados Silvinho, Tatiana, Kelly, Luciana e Sandra, pelo convívio, amizade, e por terem, junto com meus irmãos, me dado uma das grandes felicidades da minha vida, que são meus sobrinhos.

À toda minha família, em especial às tias Rosa e Catarina, tio Mário, tio Toninho e tia Graça, pelo amor, carinho, ensinamentos e apoio.

Ao professor Maurílio Alves Moreira, pela orientação, confiança, aprendizado, disponibilidade e amizade durante esses dois anos, e pelo exemplo de dedicação, profissionalismo e força de vontade, mesmo frente às adversidades.

Ao professor Pedro Ivo Vieira Good God, pela igual orientação, confiança e aprendizado, pela amizade criada, pelos conselhos dispensados e pelo exemplo de simplicidade e profissionalismo.

Ao professor Luiz Orlando Oliveira, pela coorientação, disponibilidade, paciência e acessibilidade, e pelas sugestões e contribuições para este trabalho.

Ao doutor Newton Denis Piovesan, pela disponibilidade e participação na banca de defesa, pelos conselhos e pelo convívio e aprendizado.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela orientação durante a graduação, pela confiança, aprendizado, disponibilidade e convívio, pelo exemplo de profissionalismo e amor ao trabalho.

Ao professor Sérgio Yoshimitsu Motoike, pela confiança e disponibilização de seu banco de germoplasma para auxiliar no presente trabalho.

A todos os professores da UFV, incluindo os citados acima, pelo aprendizado e principalmente pelo exemplo profissional, que me inspiraram a investir na carreira acadêmica.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela formação acadêmica e cidadã, e pela oportunidade da realização do curso do Mestrado.

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

À pesquisadora Janaína Paula Marques Tanure, pela paciência, aprendizado e iniciação na pesquisa, e pelo convívio e amizade, que ultrapassam tempo e distância.

À estagiária Roxane, pela ajuda e disponibilidade, imprescindíveis para a realização deste trabalho, pela amizade criada e pelas risadas que tornaram tudo mais agradável.

Aos companheiros de Biomol e Proteína de todos estes anos, Alexandre, Alisson, Ana Paula, Anna Rita, Bruno, Cacá, Calil, Carla, Carlos, Danielle, Demerson, Fernanda, Flávio, Franciele, Giselle, Isadora, Josiane, Josie, Kléver, Leandro, Leonardo, Loreta, Marcão, Martha, Matheus, Míriam, Newton, Pedro, Rafael, Renato e Suellen, pelo convívio, conselhos, ajuda e paciência, e pela amizade criada.

Aos funcionários Cássio, Édson, Gláucia, Marlene, Naldo e Zé Carlos, pelo trabalho de suporte, disponibilidade, ajuda e amizade.

Aos companheiros das repúblicas Casa Muito Engraçada, 2211 e Jogatina, pela amizade, paciência, companheirismo e diversão, e por terem sido durante estes sete anos parte importante da minha família.

Aos amigos do truço do DCE, pela amizade, companheirismo, pelas boas histórias e incontáveis risadas.

A todos os amigos que fiz em Viçosa, da Agronomia, da pós-graduação, do futebol e dos bares, em especial, Daniboy, Ignácio, Júlio, Nayara, Tody e Wesley, por estarem sempre ao meu lado e me ajudarem a construir todas as histórias que vivi aqui, e por me tornarem uma pessoa melhor.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA

Luiz Cláudio Costa Silva, filho de Francisco Guerra Silva e Maria Eugênia da Costa Silva, nasceu em Manhuaçu, Minas Gerais, em 19 de Julho de 1987. Residente em Manhuaçu, concluiu o ensino médio no Centro Educacional de Manhuaçu, em 2004.

Em Maio de 2006, iniciou o curso de graduação em Agronomia na Universidade Federal de Viçosa (UFV). Graduou-se Engenheiro Agrônomo em Janeiro de 2011.

Em Fevereiro de 2011, iniciou o curso de mestrado em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do professor Maurilio Alves Moreira, submetendo-se à defesa da dissertação em 15 de Março de 2013.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Caracterização da macaúba.....	2
2.2. Utilização da Macaúba	4
2.3. Avaliação da estrutura genética de populações naturais	5
2.4. Estudos de filogeografia molecular de populações naturais	8
2.5. Melhoramento Genético da Macaúba.....	9
3. OBJETIVOS	10
3.1. Objetivo Geral.....	10
3.2. Objetivos específicos.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1. Coleta de Material Vegetal.....	11
4.2. Extração de DNA.....	14
4.3. Caracterização da estrutura genética populacional.....	15
4.3.1. Amplificação com <i>primers</i> SSR.....	15
4.3.2. Amplificação com <i>primers</i> ISSR	17
4.3.3. Análises estatísticas	18
4.4. Estudos Filogeográficos	18
5. RESULTADOS	20
5.1. Caracterização da estrutura genética populacional.....	20
5.2. Filogeografia molecular	25
6. DISCUSSÃO	29
7. CONCLUSÕES.....	32
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

RESUMO

SILVA, Luiz Cláudio Costa. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Março de 2013. **Estrutura genética e filogeografia molecular de populações naturais de *Acrocomia aculeata* nos estados de Minas Gerais e São Paulo.** Orientador: Maurilio Alves Moreira. Coorientadores: Luiz Orlando de Oliveira e Pedro Ivo Vieira Good God.

A crescente procura mundial por fontes de energia renovável têm direcionado vários estudos com espécies oleaginosas, visando à produção de biodiesel. Dentre as várias espécies nativas com potencial para a produção de óleo, a macaúba (Arecaceae: *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart.)) se destaca por seu grande potencial produtivo e menor demanda por água, além da perspectiva por geração de emprego e renda. Este trabalho teve por objetivo investigar a estrutura genética e os padrões filogeográficos de populações de *Acrocomia aculeata*, distribuídas nos Estados de Minas Gerais e São Paulo. Os estudos foram realizados a partir da amostragem de 64 palmeiras distribuídas em sítios naturais de ocorrência da espécie, e por oito indivíduos de um Banco Ativo de Germoplasma, provenientes de palmeiras amostradas em diferentes estados. As 64 palmeiras foram genotipadas através de cinco marcas microssatélites (SSR) e 11 marcas ISSR, e foi realizado o sequenciamento da região ITS dos genes nucleares de RNA ribossomal, e do espaçador *trnT-trnL* de cpDNA de todos indivíduos. Os altos valores de índice de fixação encontrados indicam que a espécie possui sistema reprodutivo misto. Análises de agrupamento e AMOVA revelaram que existe um certo nível de estruturação genética, com relação aos locais de coleta, mas que a maior parte da variabilidade genética está dentro de grupos formados *a priori*. Apesar de aparentar abrigar sítios polimórficos, não foi possível realizar o completo alinhamento das sequências do espaçador *trnT-trnL*. O sequenciamento da região ITS gerou um fragmento de 667 bp, abrigando 4 sítios polimórficos, que diferenciaram 4 haplótipos. O baixo nível de polimorfismo encontrado sugere que a ocupação da área por *A. aculeata* foi recente. Dois indivíduos localizados na região Nordeste e dois indivíduos localizados no sudoeste do Mato Grosso do Sul abrigaram metade da variabilidade haplotípica encontrada. Apesar de

AMOVA indicar que a amostragem dentro de grupos é a mais indicada para a região amostrada, os dados gerados pelas sequencias ITS indicam que a amostragem em outras regiões, como Mato Grosso do Sul e região Nordeste, podem revelar níveis significativos de variabilidade genética.

ABSTRACT

SILVA, Luiz Cláudio Costa. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2013. **Genetic structure and molecular phylogeography of natural populations of *Acrocomia aculeata* on Minas Gerais and São Paulo states.** Adviser: Maurilio Alves Moreira. Co-advisers: Luiz Orlando de Oliveira and Pedro Ivo Vieira Good God.

The growing worldwide search for renewable energy sources has directed several studies with oleaginous species, aiming biodiesel production. Among the many native species with potential for oil production, the macaw palm (Areceaceae: *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. Ex Mart.) stands out for its great yield potential and lower demand for water, and the perspective for generating for employment and income. This study aimed to investigate the genetic structure and the phylogeography patterns of *Acrocomia aculeata* populations on Minas Gerais and São Paulo states. The studies were performed from 64 palm trees sampling distributed in natural occurrence sites of the species, and eight individuals of a Active Germplasm Bank from palm trees sampled in different states. The 64 palm trees were genotyped through five microsatellites markers (SSR) and 11 ISSR markers, and we performed the sequencing of the ITS region of the RNA ribossomal nuclear genes, and the *trnT-trnL* cpDNA spacer of all individuals. The high value of fixation index found indicate that species has a mixed mating system. Cluster analyses and AMOVA revealed that there is a degree of genetic structure, in relation of the collection points, but the most of genetic variability is inside the groups formed *a priori*. Despite appearing to harbor polymorphic sites, was not possible to perform the full alignment of the *trnT-trnL* spacer sequences. The sequencing of the ITS region generated a 667 bp fragment, harboring 4 polymorphic sites that differed 4 haplotypes. The low level of polymorphism found suggests that occupation of the area by *A. aculeata* were recent. Two individuals located on Northeast region and two individuals located on southwestern of the Mato Grosso do Sul state harboring half of the haplotypic variability found. Although AMOVA to indicate that sampling within groups is more appropriated for the sampled area, the generated data by ITS sequences indicate the sampling in other regions, such as Mato Grosso do

Sul state and Northeast region, may reveal significant levels of genetic variability.

1. INTRODUÇÃO

Desde a invenção do motor de ciclo diesel, há mais de 100 anos, os óleos vegetais são conhecidos como forma de combustível alternativa. Entretanto, o interesse no desenvolvimento destes óleos como combustível só foi intensificado em períodos de adversidade, como nas duas guerras mundiais e na crise de petróleo nos anos 70. Entretanto, com o aumento da preocupação com as questões ambientais, e as perspectivas de declínio nas reservas de energia fóssil mundial o interesse em combustíveis alternativos tem sido renovado (Raneses, 1999).

Em 2002, o governo lançou o Programa Brasileiro de Biocombustíveis, com o intuito de desenvolver tecnologias para produção de biodiesel, visando diminuir a dependência de combustíveis fósseis, utilizando fontes de energia renováveis e reduzindo a emissão de gases causadores do efeito estufa. Além disso, indiretamente levar a um aumento na geração de empregos e renda, principalmente pelo estímulo à agricultura familiar (Moura, 2007). Nesse contexto, existe forte discussão sobre quais plantas oleaginosas devem ser utilizadas visando a produção do biodiesel. O Brasil apresenta grande potencial na produção de matéria prima vegetal para a produção de biocombustíveis. O país conta com a maior área agricultável do mundo, com cerca de 200 milhões de hectares, energia solar abundante, a melhor tecnologia agrícola do mundo tropical, e quase 200 espécies de plantas oleaginosas aptas para a produção de óleo para combustíveis (Beltrão, 2005), dentre as quais se destacam a macaubeira, o dendezeiro (Balick, 1979), o pequi (Araújo, 1993), entre outros.

A macaúba (Arecaceae: *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart.) é uma palmeira tropical, com ampla distribuição no território americano, e se destaca pelo grande potencial de produção de óleo, podendo chegar a 4000 kg de óleo/ha, ficando atrás apenas de outra palmeira, o dendezeiro (*Elaeis guineensis*). Entretanto, a grande vantagem em relação ao dendê é o fato de ela estar adaptada a regiões com menor pluviosidade, podendo ser indicado para a agricultura familiar nestes locais, em detrimento ao dendê, que é natural de locais de maior precipitação (Teixeira, 2005). Além disso, sua utilização não se resume apenas à produção de óleo. Sua polpa é comestível e rica em carotenoides, a casca pode ser aproveitada na

fabricação de carvão vegetal (Silva *et al.*, 1986), e amêndoa tem alto valor proteico, tendo seu óleo comparado com azeites de boa qualidade (Pio-Corrêa, 1984). Entretanto, apesar de seu potencial, a espécie carece de vários estudos que possam viabilizar seu cultivo de forma comercial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Caracterização da macaúba

A macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart.) é uma palmeira tropical arborescente perene, tipicamente brasileira e com ampla distribuição geográfica (Scariot, 1995). Apesar dos poucos dados citogenéticos disponíveis para a espécie, Abreu *et al.* (2011) observaram $2n=30$, para plântulas germinadas a partir de sementes de palmeiras localizadas no estado do Pará. É conhecida por vários outros nomes, tais como macaúva, coco-de-catarro, bocaiúva, coco-de-espinho, coco-baboso, macaíba, macacauba, macajuba, macabeira, mucaja, mucaia e mucajuba (no Brasil), e mbocayá, totaí, corozo, tomaco, coyol e corosse (outros países da América do Sul e Central) (Lorenzi, 2006). Tal fato pode ser usado para demonstrar sua grande distribuição geográfica, sendo encontrada desde o estado do Paraná, até a América Central e sul dos EUA. A espécie tem como habitat mais comum áreas de vegetação aberta, com alta incidência solar, e é reconhecida como indicadora de solos férteis. Além disso, é comum sua ação como colonizadora de áreas desmatadas, sendo frequente em regiões de pastagens (Scariot, 1991). A Figura 1 apresenta um mapa de distribuição de histórico de coletas de macaúba pelo território brasileiro, entre os anos de 1983 e 2012, a partir de dados disponíveis pelo Sistema de Informação Distribuído para Coleções Biológicas: A Integração do Species Analyst e do SinBiota (FAPESP) (*SpeciesLink*).

O gênero *Acrocomia* pertence à família Arecaceae, dentro da ordem Arecales, família onde estão incluídas todas as espécies de palmeiras, tais como pupunheira, palmeira-imperial, dendezeiro e coqueiro. Existem inconsistências no número de espécies pertencentes a esse gênero, devido à falta de estudos neste assunto. Henderson *et al.* (1995) comentam que muitas dessas espécies na verdade são sinônimas de *A. aculeata*, como a *A. totai*, *A. mexicana*, *A. media*, entre outras.

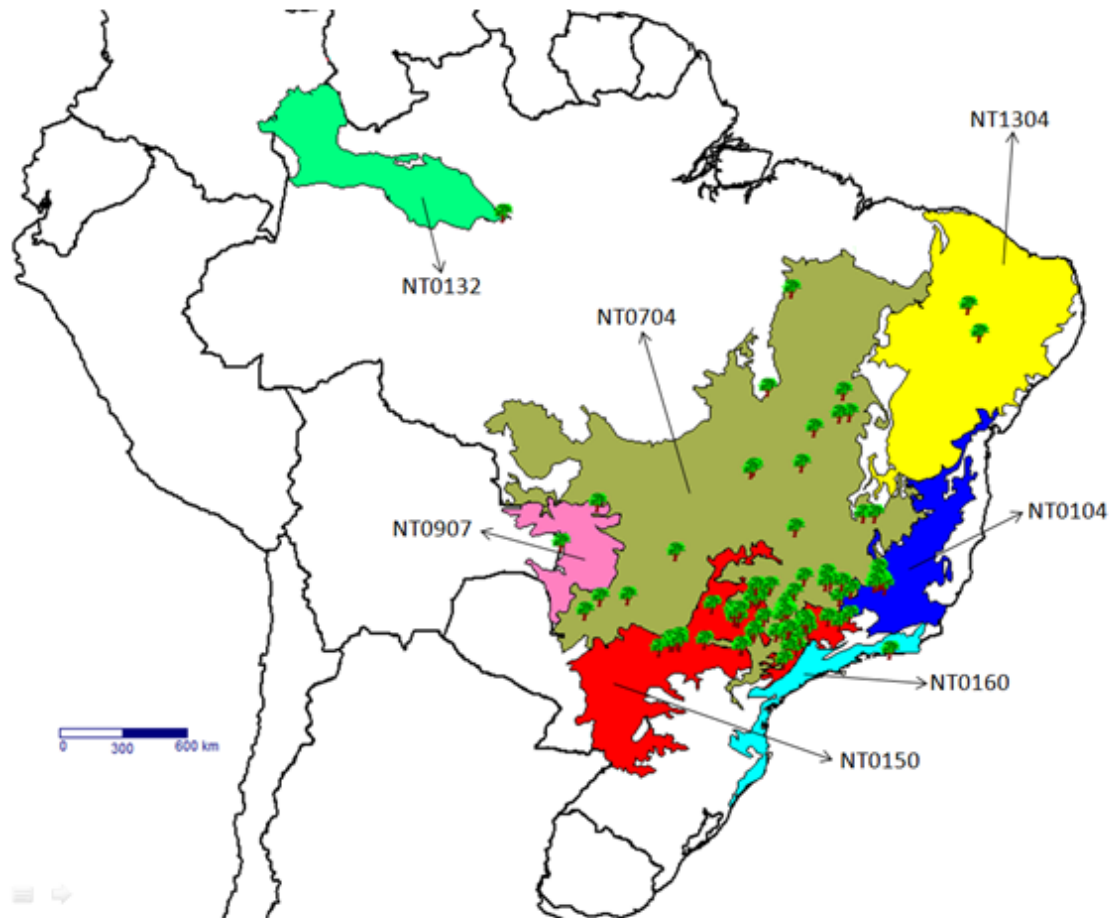


Figura 1 – Histórico de coletas de *Acrocomia aculeata* no território brasileiro, a partir de dados disponíveis pelo Sistema de Informação Distribuído para Coleções Biológicas: A Integração do Species Analyst e do SinBiota (FAPESP) (*SpeciesLink*). As ecorregiões apresentadas são: NT1304 (Caatinga), NT0132 (Florestas Úmidas do Rio Negro-Juruá), NT0704 (Bosques e Savanas do Cerrado), NT0104 (Florestas Interiores da Bahia), NT0160 (Florestas Costais da Serra do Mar), NT0150 (Mata Atlântica do Alto Paraná), NT0907 (Savanas Alagadas do Pantanal), de acordo com Olson (2001).

Possui tronco único, do tipo estipe, ereto, podendo atingir até 15 metros de altura. Apresenta grande incidência de espinhos escuros na superfície, especialmente na região dos nós (característica do gênero). O caule é recoberto pelas bases persistentes das folhas, que são pinadas e de comprimento variado, chegando a 5 metros. Os folíolos são dispostos para cada lado da região central da folha, que é recoberta de espinhos, em número aproximado de 130 (Lorenzi *et al.*, 2004).

A floração ocorre entre agosto e novembro. As inflorescências são amareladas, pequenas, agrupadas em cachos pendentes, de até 80 cm de comprimento, protegidas por uma espata que pode atingir até 2 metros de comprimento. As flores são unissexuais, ficando as masculinas agrupadas no topo, enquanto que as femininas situam-se na base. Tais flores são andróginas, apresentando protoginia. A polinização ocorre principalmente por meio de besouros (Coleoptera). Apesar do favorecimento à fecundação cruzada, a gitonogamia ocorre em taxas consideráveis, sendo considerada uma planta de fecundação mista (Nucci, 2007).

A frutificação ocorre a partir dos 4 a 5 anos de idade. O fruto é globoso com 25 a 50 mm de diâmetro, liso, de coloração marrom-amarelada quando maduro, apresenta mesocarpo branco ou amarelado, fibroso e mucilaginoso. Cada fruto contém uma amêndoa oleaginosa, contendo de um a três embriões viáveis, envolvida por um endocarpo rígido. Frutifica durante o ano todo, principalmente de setembro a janeiro. Em um estudo realizado no Distrito Federal, no Brasil Central foi observado que cada inflorescência produz em média 60 frutos, mas esse número pode variar de 0 a 271, conforme a região (Scariot *et al.*, 1995). O período de produção de frutos excede os 50 anos (Nucci, 2007).

2.2. Utilização da Macaúba

Várias são as formas de utilização da macaúba, principalmente por comunidades familiares, muitas vezes ligados a costumes tradicionais, utilizando frutos, folhas e caule. Os frutos são a parte da planta com maior utilidade. O mesocarpo é usado no preparo de doces, geléias, paçocas e cocadas, além de ser consumido também *in natura*. Pode também servir como fortificante. O óleo extraído do mesocarpo é utilizado como combustível e para produção de sabão, lubrificante, licores e sorvetes, como medicinal (ação analgésica e contra nevralgias), como cosmético (hidratante capilar) (Lorenzi, 2006). O carvão produzido pela carbonização do endocarpo é considerado de melhor qualidade para determinados usos, como produção de matéria prima para gasogênios, siderúrgica e uso doméstico, quando comparado com o carvão da madeira de eucalipto (*Eucalyptus sp.*) (Silva, 1986).

A folha pode ser usada como alimento para o gado, para artesanato e cobertura de construções. A amêndoa é um componente bastante nobre, podendo ser consumida *in natura*, ou na forma de paçocas. O óleo extraído da amêndoa tem alto valor nutritivo, sendo comparado ao azeite de oliva, podendo ser utilizado como óleo de cozinha, hidratante capilar, laxante, dentre outros. Alguns outros usos relatados são a extração de palmito do meristema apical, confecção de mourões, estacas e paredes utilizando a estipe, e produção de vinho com a seiva (Lima *et al.*, 2003).

Dentre as várias oleaginosas com potencial para exploração comercial no Brasil, a macaúba é uma das que apresenta melhores perspectivas na produção de biodiesel. Isso se deve essencialmente a três aspectos. O primeiro é o grande potencial de produção de matéria prima. O segundo é a adaptação a ambientes com menor disponibilidade de água, questão que vem ganhando cada vez maior importância. Por último, a possibilidade de garantia de emprego e renda para populações de sua região de origem, como modo de frear as correntes migratórias e melhorar a qualidade de vida dessas populações (MDA, 2006).

A Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC) em estudos que avaliaram macaubais nativos em solos de média fertilidade, com produção aproximada de 100 kg de frutos/árvore/ano, concluiu que, em plantios racionais com espaçamento 7 m x 7 m, pode-se esperar uma produtividade mínima de 20.000 kg/ha/ano de frutos. Esta produtividade pode aumentar muito através de manejo adequado, com a possível redução do espaçamento para 6 m x 6 m e melhoramento da espécie. Outro fato importante é a possibilidade de sistemas de consorciação, em destaque com forrageiras. Em levantamento realizado em maio de 2006, o custo estimado para produção de um hectare de macaúba foi de R\$ 7.000,00 por ano, e a produção por hectare inclui 4.000 litros de óleo vegetal, 1.200 kg de carvão vegetal, e 5.300 kg de farelos para rações (Oliveira, 2006).

2.3. Avaliação da estrutura genética de populações naturais

O estudo de diversidade genética em populações naturais compreende a descrição dos níveis de variabilidade genética mantida dentro das populações, assim como o modo com que essa variabilidade se

encontra distribuída entre e dentro das mesmas (Hamrick, 1983). Fatores evolutivos, como seleção e deriva, são afetados pela dinâmica populacional das plantas, proporcionando mudanças na estrutura genética das populações (Gaiotto *et al.*, 2003). Ao longo do tempo, a estrutura genética é resultante da reprodução, da dispersão e da sobrevivência dos indivíduos de uma população. Portanto, é importante mesclar o conhecimento dos sistemas de acasalamento e reprodução, a história de vida e os fatores ecológicos, pois os mesmos têm papéis importantes na dinâmica evolutiva e ecológica das populações naturais (Loveless *et al.*, 1998).

Populações que sofreram com processos de fragmentação estão mais sujeitas aos efeitos da endogamia e deriva genética, devido à redução de seu tamanho. Portanto, paisagens que passaram por processos de fragmentação, formando populações pequenas e isoladas, estão mais sujeitas a esses efeitos genéticos, levando, na maioria das vezes, a uma menor variabilidade genética (Futuyma, 2002).

A variação genética é condição fundamental para que ocorra evolução, pois a seleção natural atua nas diferenças que ocorrem dentro das populações. Assim, uma maior variabilidade genética na população condiciona maiores chances de sucesso diante de mudanças ambientais (Jones *et al.*, 2001). Espécies de ampla distribuição geográfica, vida longa, reprodução cruzada e dispersão de sementes por animais apresentam maiores níveis de variabilidade genética. Assim espécies alógamas possuem maior variabilidade, dentro de suas populações, que espécies autógamias. (Hamrick e Godt, 1989).

Em populações naturais, os estudos genéticos têm por finalidade analisar e quantificar a variabilidade genética distribuída no tempo e no espaço, sua distribuição intra e entre populações, permitindo melhor entendimento de como a seleção está atuando em função da adaptabilidade (Estopa *et al.*, 2006). Quando o objetivo final são aplicações em programas de melhoramento, estudos de diversidade genética podem fornecer dados de onde e como coletar o material vegetal, de modo a estabelecer um banco de germoplasma que seja representativo da variabilidade genética da espécie.

A quantificação da diversidade genética pode ser feita por marcadores morfológicos, bioquímicos ou moleculares. Os primeiros a serem utilizados foram os marcadores morfológicos, pela maior facilidade do processo. Na década de 60, foram criados os marcadores isoenzimáticos, que facilitaram os estudos de variação genética (Estopa *et al.*, 2006). Na década de 80, a criação de marcadores moleculares baseados em DNA alavancou ainda mais o processo. Em estudos populacionais de espécies arbóreas, os marcadores moleculares têm se mostrado uma ferramenta útil.

São vários os tipos de marcadores moleculares que podem ser utilizados para os estudos de diversidade genética, dentre os quais, podem ser citados os SSR (Simple Sequence Repeats – microssatélites), RAPD (Random Amplification Of Polymorphic DNA), AFLP (Amplified fragment length polymorphism) e ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) (Nybom, 2004).

Marcadores do tipo ISSR podem ser utilizados para trabalhos com espécies pouco estudadas. Isso porque sua metodologia não necessita de conhecimentos prévios sobre a estrutura do genoma, nem a utilização de *primers* específicos. Estudos também demonstram que os ISSR detectam níveis de polimorfismo similares ou superiores aos RFLP e RAPD (Godwin *et al.*, 1997). Microssatélites, ou marcadores moleculares baseados em Sequências Simples Repetidas (SSR), consistem na repetição de sequências de um a seis nucleotídeos, e são encontrados no genoma de vários organismos (Goldstein e Schlotterer, 2001). Como principais características, podemos destacar a codominância, o multialelismo e altas taxas de polimorfismo.

Trabalhos como os de Camacho e Liston (2001) e Qiu *et al.* (2003), utilizaram locos ISSR para avaliar a diversidade e estrutura genética de populações naturais de *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae), e *Changium smyrnioides* e *Chuanminshen violaceum* (Apiaceae), respectivamente.

Do mesmo modo, marcadores do tipo SSR têm sido utilizados em vários estudos, visando acessar a estrutura genética e estimar a variabilidade genética em populações naturais. Podemos citar trabalhos como os de Collevati *et al.* (2001), Gaiotto *et al.* (2003), Lemes *et al.* (2003),

Cole *et al.* (2007), Nucci (2007), trabalhando as espécies *Caryocar brasiliensis* (Arecaceae), *Euterpe edulis* (Arecaceae), *Swietenia macrophylla* (Meliaceae), *Bactris gasipaes* (Arecaceae) e *Acrocomia aculeata* (Arecaceae), respectivamente.

2.4. Estudos de filogeografia molecular de populações naturais

A filogeografia é uma área de estudo que visa integrar princípios e processos relacionados com a distribuição espacial e temporal de linhagens genealógicas, interespecificamente ou entre espécies muito próximas (Avice *et al.*, 2000). A filogeografia se encaixa num contexto temporal, com perspectivas mais amplas do que a ecogeografia tradicional, que foca no papel de pressões ecológicas contemporâneas, moldando as distribuições no espaço das características dos organismos. Porém, ecogeografia e filogeografia podem atuar em conjunto, com a filogeografia expandindo e equilibrando as perspectivas ecogeográficas (Thorpe *et al.*, 1995).

Além de conseguir apresentar os padrões genéticos das populações naturais no presente, a filogeografia fornece perspectivas para entender como as populações vêm se comportando ao longo do tempo, perceber padrões de variação em seu tamanho efetivo (N_e) e interpretá-los sob o ponto de vista evolutivo e biogeográfico. Isto é particularmente importante no que se refere à conservação da diversidade genética da espécie (Templeton, 2004).

Para a realização das análises, vários tipos de dados podem ser utilizados, tais como marcadores dominantes, marcadores codominantes e sequências de DNA. Para as sequências de DNA, existe uma preferência por DNA de organelas (mitocôndrias para animais e cloroplastos para plantas), pois estas são geralmente haplóides, com herança materna. Para o DNA nuclear, espaçadores de sequências transcritas são muito úteis, e geralmente se apresentam bastante informativos. É importante evitar regiões codificantes, pois estas podem estar sobre intensa seleção (Rossi, 2007).

Inúmeros trabalhos utilizando abordagens filogeográficas têm sido encontrados na literatura, de modo a identificar padrões de congruência entre a distribuição geográfica dos haplótipos e suas relações genealógicas (Schaal *et al.*, 1998), fornecer suporte para decisões no ramo da

conservação de espécies (Collevatti *et al.*, 2003), verificar relações filogenéticas e reconstruir a história de possíveis eventos de dispersão (Lessios *et al.*, 1999), inferir rotas de colonização de espécies florestais (Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997), entre outras aplicações.

Apesar de ser uma ferramenta poderosa no entendimento da dinâmica populacional das espécies no binômio espaço x tempo, relativamente poucos estudos filogeográficos com plantas nativas do território brasileiro são encontrados na literatura, principalmente no que se refere à família Arecaceae.

2.5. Melhoria Genética da Macaúba

Atualmente, a exploração da macaúba é feita através do extrativismo. Para a utilização comercial da macaúba como fonte de óleo para produção de biodiesel, se faz necessário o melhoramento genético da espécie, haja vista que as populações naturais apresentam grande heterogeneidade com relação a várias características agronômicas importantes.

Ao contrário de outras espécies cultivadas no mundo, que vêm sendo alvo de seleção há milhares de anos, como o milho e o trigo, a macaúba é uma espécie silvestre, que sofreu mínima ou nenhuma seleção antrópica.

A etapa de preparação para o melhoramento, ou pré-melhoramento, envolve atividades que visam dar suporte ao melhoramento genético propriamente dito, como coleta, implantação de um banco ativo de germoplasma e caracterização da diversidade genética existente para a espécie, visando à identificação de genótipos promissores (Manfio, 2010).

A identificação da diversidade genética através de caracteres morfo-agronômicos, aliada ao uso de marcadores moleculares, é muito utilizada pelos melhoristas com a finalidade de escolher genitores e cruzamentos com potencial para geração de boas populações segregantes (Manfio, 2010). É necessário, portanto, determinar quais os caracteres que melhor avaliam a divergência genética entre os genótipos, o modo como eles devem ser avaliados, o controle genético destes caracteres e correlação entre eles.

Manfio (2010), avaliando várias características fenotípicas de 145 matrizes de *Acrocomia aculeata*, provenientes de seis estados brasileiros, e plantas em fase juvenil de 51 progênies dos estados de Minas Gerais e São

Paulo, concluiu que as características que mais contribuíram para a diversidade genética entre as matrizes foram espessura do endocarpo, diâmetro de fruto, volume da amêndoa e o peso do fruto. No mesmo trabalho, avaliando diversas características do fruto, este autor concluiu que quatro frutos são suficientes para a avaliação das características estudadas, com coeficiente de determinação de 90%. Ainda no mesmo trabalho, avaliando progênies de macaúba na fase juvenil, foram encontrados coeficientes de herdabilidade de 87% e 48% para número de folhas e o crescimento de plantas.

Avaliando frutos de matrizes de diferentes espécies do gênero *Acrocomia*, Conceição *et al.* (2012) encontraram rendimentos de óleo em base úmida variando de 7,17% a 25,96%. Uma matriz proveniente de Lagoa Formosa, MG, apresentou rendimento de óleo em base úmida de 25,96%, sendo o primeiro relato de macaubeira com rendimento acima de 25% para esta característica, sendo comparável a alguns cultivares de dendezeiro.

A partir da avaliação de diversas características biométricas e teor de óleo de macaubeiras de sítios representativos do Cerrado e Pantanal brasileiros, Ciconini *et al.* (2013) não encontraram correlação entre as características biométricas e teor de óleo. Em média, as palmeiras de Campo Grande-MT apresentaram as melhores características produtivas gerais. Palmeiras de Corumbá-MS apresentaram frutos menores, porém mais homogêneos, e com maiores teores de óleo. Os frutos colhidos em São Gabriel do Oeste-MS foram os maiores e de maior massa, mas não mostraram maiores teores de óleo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo investigar a estrutura genética e os padrões filogeográficos de populações naturais de *Acrocomia aculeata*, distribuídas nos Estados de Minas Gerais e São Paulo.

3.2. Objetivos específicos

- Coletar amostras de folha e fruto, em diferentes regiões dos Estados de Minas Gerais e São Paulo, para extração de DNA e formação de um banco ativo de germoplasma para a espécie *Acrocomia aculeata*;
- Selecionar marcadores SSR e ISSR polimórficos para a espécie;
- Genotipar as subamostras coletadas utilizando marcadores SSR e ISSR;
- Sequenciar a região ITS dos genes nucleares de RNA ribossomal 18S-26S e o espaçador *trnT-trnL* do genoma de cloroplasto;
- Acessar a diversidade genética entre e dentre populações, através do cálculo de coeficientes genéticos.
- Acessar a história evolutiva das populações, através de análises filogeográficas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta de Material Vegetal

Foram realizadas coletas nos meses de Janeiro, Fevereiro, Outubro e Novembro de 2011, e Janeiro de 2012, em parte dos estados de Minas Gerais e São Paulo. Foram acessadas 64 palmeiras de populações naturais destes locais, e cada palmeira teve sua localização marcada, com o auxílio de um aparelho GPS. Foram coletadas amostras foliares de cada uma delas e também frutos maduros, quando disponíveis. Para as coletas, foi utilizado um sistema composto por foice, podão, e cabos de madeira e emendas, de modo que os cabos pudessem ser unidos.

As amostras foliares foram armazenadas em sacos plásticos de fechamento hermético, e acondicionados inicialmente em caixa com gelo, e posteriormente em freezer a -75° C. Os frutos foram armazenados em sacos de ráfia, à temperatura ambiente. Após alguns meses, os frutos tiveram o epicarpo quebrado e o mesocarpo (polpa) removido mecanicamente em um despoldador, após ficarem em solução de hidróxido de sódio por cerca de um dia. Posteriormente, os frutos foram lavados em água corrente, e o endocarpo foi quebrado cuidadosamente em uma prensa mecânica, para remoção da amêndoa. As amêndoas foram acondicionadas em câmara fria,

e atualmente estão em processo de germinação, sob supervisão do professor Sérgio Yoshimitsu Motoike, do Departamento de Fitotecnia/UFV.

A priori, os indivíduos foram agrupados, com base em um zoneamento agroecológico/econômico, em cinco grupos: Alto Paranaíba (AP), Norte de Minas Gerais (NM), Belo Horizonte e região (BH), Triângulo Mineiro e Noroeste de São Paulo (NS), Nordeste de São Paulo e Sul de Minas Gerais (SM). A Figura 2 apresenta a distribuição dos 64 indivíduos coletados distribuídos nos cinco grupos, e a Tabela 1 apresenta os dados geográficos dos mesmos.

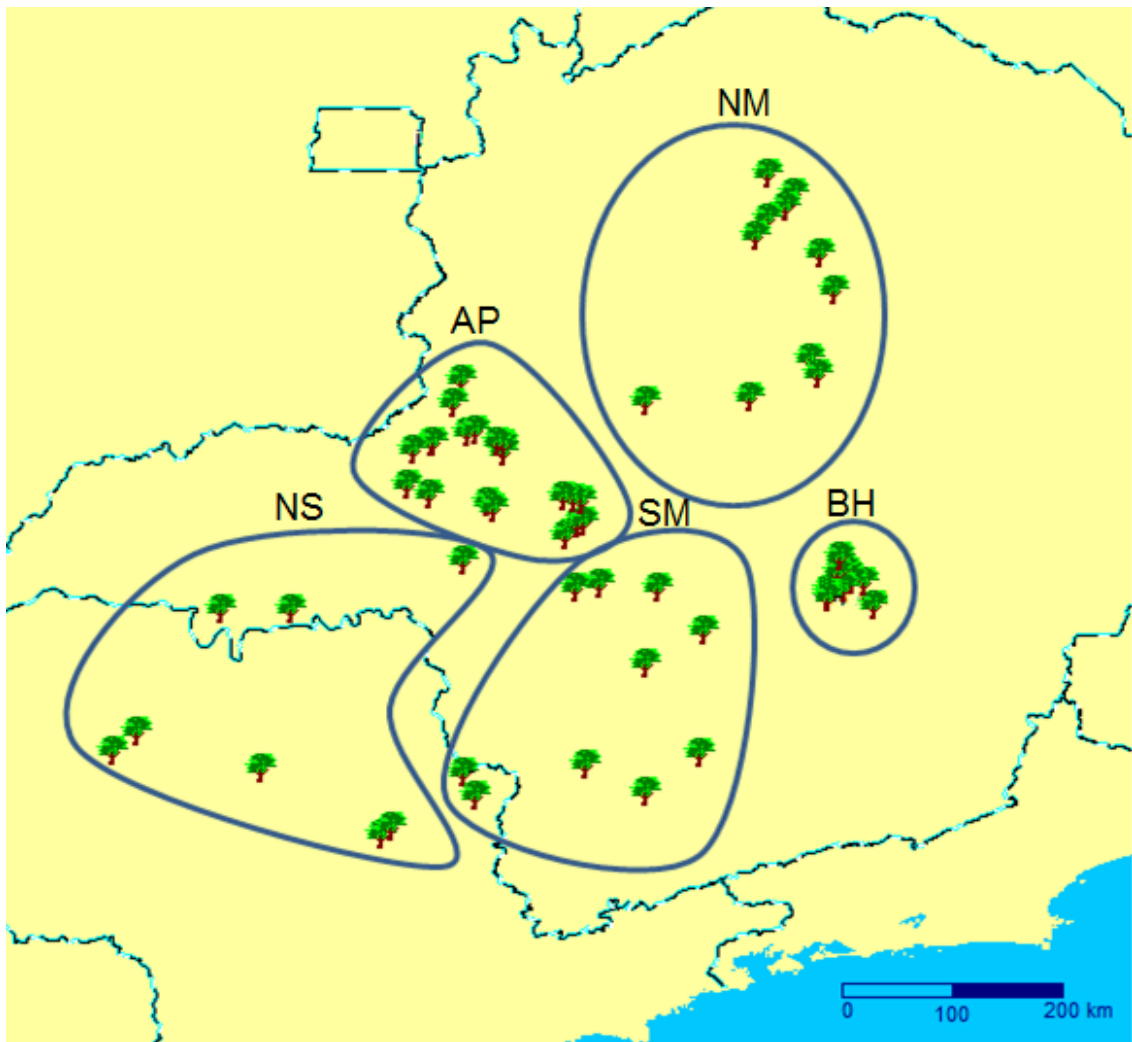


Figura 2 – Distribuição dos 64 indivíduos coletados nos cinco grupos formados *a priori*.

Tabela 1 – Dados geográficos dos 64 indivíduos de *Acrocomia aculeata* coletados nos estados de Minas Gerais e São Paulo.

Indivíduo	Latitude	Longitude	Indivíduo	Latitude	Longitude
AP01	19°18'38,6" S	46°06'25,8" W	NM09	17°52'17,8" S	43°57'33,8" W
AP02	19°13'00,5" S	46°0'33,9" W	NM10	18°05'27,2" S	44°31'30,2" W
AP03	19°12'5,9" S	45°57'20,3" W	NM11	18°07'28,8" S	45°25'27,7" W
AP03-1	19°12'7,8" S	45°57'24,2" W	BH01	19°57'01,0" S	43°28'21,1" W
AP04	18°59'56,9" S	45°57'35,7" W	BH02	19°44'37,0" S	43°33'13,9" W
AP05	18°59'31,1" S	46°01'56,3" W	BH03	19°43'15,2" S	43°39'51,6" W
AP05-1	18°59'31,1" S	46°01'56,5" W	BH04	19°38'45,6" S	43°41'48,4" W
AP06	18°58'48,1" S	46°07'19" W	BH05	19°37'13,7" S	43°44'05,6" W
AP07	18°34'12,7" S	46°37'34,9" W	BH06	19°47'15,4" S	43°44'18,5" W
AP08	18°29'59,3" S	46°38'29,9" W	BH07	19°48'52,4" S	43°52'29,9" W
AP08-1	18°30'00,6" S	46°38'29,4" W	BH08	19°38'28,5" S	43°46'39,0" W
AP09	18°28'46,5" S	46°41'10,9" W	BH09	19°30'43,5" S	43°45'39,8" W
AP10	18°23'53,7" S	46°56'30" W	BH10	19°49'58,4" S	43°52'17,4" W
AP11	18°22'18,4" S	46°51'58,5" W	BH11	19°52'34,0" S	43°52'27,3" W
AP12	17°56'07,3" S	46°59'15,8" W	NS01	19°32'54,0" S	46°58'38,8" W
AP13	18°29'26,5" S	47°14'52,5" W	NS02	19°58'21,4" S	48°26'31,4" W
AP14	18°08'23,7" S	47°03'37,9" W	NS03	19°59'47,8" S	49°02'03,8" W
AP15	18°28'53" S	47°13'54,5" W	NS04	21°15'18,4" S	49°57'26,4" W
AP16	18°33'13,9" S	47°24'30,6" W	NS05	21°04'40,9" S	49°45'44,7" W
AP17	18°51'47,7" S	47°27'09,6" W	NS06	21°24'33,2" S	48°41'37,1" W
AP17-1	18°51'47,7" S	47°27'09,6" W	NS07	21°59'57,7" S	47°40'45,8" W
AP18	18°56'59,3" S	47°16'26,4" W	NS08	21°55'38,1" S	47°35'42,5" W
AP19	19°00'57,7" S	46°51'58,2" W	SM09	21°26'40,7" S	46°58'51,8" W
AP20	19°04'23,5" S	46°42'49,7" W	SM10	21°39'28,6" S	46°51'56,4" W
NM00	16°48'5,4" S	43°56'4,6" W	SM11	21°37'14,2" S	45°25'44,4" W
NM01	16°15'42,7" S	44°09'4,5" W	SM12	21°22'29,6" S	45°56'14,3" W
NM02	16°22'41,2" S	44°13'28,9" W	SM13	21°15'53,2" S	44°57'37,6" W
NM03	16°5'19,8" S	44°23'11,9" W	SM14	20°28'29,0" S	45°24'46,5" W
NM04	16°29'25,4" S	44°22'25,6" W	SM15	20°09'50,7" S	44°55'41,3" W
NM05	16°38'7,4" S	44°28'28,4" W	SM16	19°47'00,1" S	45°19'19,0" W
NM06	17°7'42,4" S	43°49'16,6" W	SM17	19°45'35,8" S	45°48'40,2" W
NM07	17°44'27,8" S	44°00' 50,0" W	SM18	19°47'20,1" S	46°01'29,5" W

4.2. Extração de DNA

As amostras foliares foram submetidas ao protocolo de extração de DNA de Doyle e Doyle (1990), com modificações. As amostras foliares foram congeladas na presença de nitrogênio líquido, maceradas, agitadas e

transferidas para microtubos com 750 μ L de tampão de extração. Este tampão foi composto por CTAB 2% (m/v), NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris HCl 100 mM (pH=8,0), PVP 2% e β -mercaptoetanol 0,2%. As amostras foram deixadas em banho-maria por no mínimo 30 min, em temperatura de 65 °C, sendo agitadas de 10 em 10 min. Após serem retiradas do banho-maria, foram adicionados 750 μ L de solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), agitadas por cerca de 10 min e centrifugadas a 14.000 rpm por 6 min. Os sobrenadantes foram removidos e transferidos para novos microtubos, e foram adicionados 600-700 μ L de isopropanol gelado. O material foi precipitado em freezer a -75 °C por cerca de duas hh, e centrifugado a 14.000 rpm por 6 min. O sobrenadante foi descartado, e foram adicionados cerca de 400 μ L de etanol 70% ao *pellet*. Após leve agitação, os microtubos foram novamente centrifugados a 14.000 rpm por 6 min. O sobrenadante foi descartado e a etapa de lavagem foi repetida. Após a secagem das amostras em capela de exaustão, foram adicionados 300 μ L de solução, contendo Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM e 40 μ g/mL da enzima RNase. Após permanecerem em banho-maria a 37 °C por 30 min, foram adicionados 30 μ L de NaCl 5 M e 220 μ L de isopropanol gelado, e precipitadas a cerca de -5 °C *overnight*. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 6 min, o sobrenadante foi removido e foram adicionados 400 μ L de etanol 70%. Após leve agitação, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante foi removido, e foram adicionados 400 μ L de etanol 95%. Uma última centrifugação foi realizada, o sobrenadante foi descartado, e as amostras foram secadas em capela de exaustão. Por fim, foram adicionados 100 μ L de água ultra pura e as amostras foram deixadas em banho-maria a 37 °C por 30 min, e acondicionadas em freezer a -20 °C.

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000c, Uniscience, e sua qualidade foi verificada em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, submetido a uma tensão de 120 V por cerca de 1 h. As amostras foram diluídas em soluções de trabalho, concentração de 10 ng/ μ L.

4.3. Caracterização da estrutura genética populacional

4.3.1. Amplificação com *primers* SSR

Trinta e seis pares de *primers* do tipo SSR, descritos por NUCCI (2007), foram adquiridos e utilizados para amplificar uma amostra inicial de cinco indivíduos, escolhidos por apresentarem maior distância física entre os locais de coleta. As reações de amplificação foram realizadas em volume de 15 μ L, contendo 30 ng de DNA, tampão-PCR 1X, $MgCl_2$ 2,0 μ M, desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) 100 μ M, *primer* 0,67 μ M e 1U de *Taq* DNA polimerase. A reação de PCR foi programada para uma etapa inicial a 94 °C por 4 min, 35 ciclos compostos por três etapas (94 °C por 40 seg, T_m por 40 seg e 72 °C por 1 min), seguidos por uma etapa final a 72 °C por 7 min. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 10% em tampão de corrida TAE 1X a 130 V por 4 h. Para visualização dos fragmentos, foi utilizado o protocolo de coloração com prata. Inicialmente, o gel foi submetido à solução fixadora (10% etanol e 0,5% de ácido acético glacial) sob agitação por 10 min. Em seguida, a solução foi descartada, e a solução de nitrato de prata 0,2% foi adicionada sob agitação por 10 min. Em seguida, a solução de nitrato de prata foi descartada, o gel foi lavado com água purificada, e foi adicionada a solução reveladora (NaOH 0,75 M e formaldeído 0,6%) sob agitação. Quando os fragmentos se tornaram visíveis, foi adicionada solução de etanol 60% para interromper a reação. Por fim, os géis foram fotografados para análise. A determinação do tamanho dos fragmentos gerados foi feita através da aplicação de um marcador de 50 pares de base, aplicado nas duas extremidades do gel, junto com as demais amostras.

Os pares de *primers* que não apresentaram amplificação satisfatória foram submetidos a uma nova reação de amplificação, realizada em volume de 30 μ L, contendo 30 ng de DNA, tampão-PCR 1X (Phoneutria), $MgCl_2$ 1,5 mM, desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) 125 μ M, *primer* 0,4 μ M, e 1U da enzima *Taq* DNA polimerase. A PCR foi programada para uma etapa inicial a 95 °C por 5 min, 30 ciclos compostos por três etapas (94 °C por 1 min, temperatura média de anelamento por 1 min e 72 °C por 1 min), seguidos por uma etapa final a 72 °C por 8 min.

Os pares de *primers* que amplificaram produtos polimórficos foram submetidos a diferentes concentrações de cloreto de magnésio, formamida e *primers*, de modo a melhorar a visualização dos produtos de amplificação

em gel de poliacrilamida, e utilizados para genotipar os 64 indivíduos coletados. A Tabela 2 apresenta os locos polimórficos, e concentrações finais de magnésio, formamida e *primers*.

Tabela 2 – Locos microssatélites polimórficos, e suas concentrações de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), formamida e *primers*.

Loco	$MgCl_2$ (mM)	Formamida (% v/v)	<i>Primers</i> (μM)
Aacu07	8,333	2,0	0,67
Aacu10	1,750	1,0	0,67
Aacu12	4,667	1,0	0,67
Aacu26	5,000	2,5	0,4
Aacu30	1,500	0	0,4

4.3.2. Amplificação com *primers* ISSR

Vinte e cinco *primers* do tipo ISSR (UBC Primer Set #9 – Microsatellite) foram utilizados para amplificar uma amostra inicial de cinco indivíduos. As reações de amplificação foram realizadas num volume de 15 μL , contendo 30 ng de DNA, 1X de tampão-PCR, $MgCl_2$ numa concentração de 3,333 mM, cada um dos desoxinucleotídeos numa concentração de 200 μM , *primer* numa concentração de 0,5 μM , formamida a 1%, e 1U de *Taq* DNA polimerase. A PCR foi programada para uma etapa inicial de 94 °C por 4 minutos, 40 ciclos compostos por três etapas (94 °C por 1 minutos, temperatura de anelamento por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos), seguidos por uma etapa final a 72 °C por 7 minutos. Os produtos de amplificação resultantes foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X (0,892 mM de tris(hidroximetil)aminometano, 0,890 mM de ácido bórico e 0,284 mM de EDTA) a 110 V por 3 horas, corados com brometo de etídeo e fotodigitalizados utilizando um fotodocumentador (L-Pix, Loccus Biotecnologia). A determinação do tamanho dos fragmentos gerados foi feita através da aplicação de um marcador de 100 pares de base, aplicado nas duas extremidades do gel, junto com as demais amostras.

Cinco *primers* que se apresentaram fragmentos reprodutíveis e polimórficos foram utilizados para genotipar os 64 indivíduos coletados. Os dados foram codificados num sistema binário, em que o valor zero (0) foi

atribuído à ausência de banda e o valor um (1) foi atribuído à presença de banda, para cada fragmento analisado.

4.3.3. Análises estatísticas

O programa Genes versão 2012.30.0001 (Cruz, 2008) foi utilizado para todas as análises de marcadores SSR e ISSR.

Para cada loco microssatélite, foram calculados Heterozigidade esperada (H_e), Heterozigidade observada (H_o) e Conteúdo de informação polimórfica (PIC). Para os grupos, foram calculados, além dos índices anteriores, o Índice de fixação (F).

A fim de avaliar os grupos formados *a priori*, foi realizada uma análise de agrupamento pelo método de Tocher, a partir dos dados dos marcadores SSR e ISSR. Foi realizada também uma análise conjunta dos dois marcadores. Para esta análise, cada alelo de cada loco microssatélite foi considerado como um loco particular, e a presença ou ausência de cada alelo foi codificada à semelhança dos locos ISSR.

A AMOVA foi realizada a fim de se verificar a partição da variabilidade genética entre e dentre grupos, sob três perspectivas: a partir dos dados de microssatélites, de ISSR, e análise conjunta dos dois tipos de marcadores. A análise foi realizada conforme Excoffier *et al* (1992), com 2 níveis hierárquicos, para verificar a partição da variação genética entre e dentre os grupos definidos *a priori*.

4.4. Estudos Filogeográficos

Para este estudo a região espaçadora entre o éxon 5' de *trnT* (UGU) e *trnL* (UAA) do genoma de cloroplasto foi amplificada utilizando-se os *primers* A e D, descritos por Taberlet *et al.* (1991). A reação de amplificação foi realizada em um volume total de 25 μ L, contendo 20 ng de DNA, tampão-PCR 1X, $MgCl_2$ 3,7 mM, desoxinucleotídeos 125 μ M, *primers* 0,5 μ M, e 1U de *Taq* DNA Polimerase. A PCR foi programada para uma etapa inicial a 94 °C por 2 min, 35 ciclos compostos por 3 etapas (94 °C por 1 min, 62 °C por 1 min e 72 °C por 2 min), seguidos por uma etapa final a 72 °C por 5 min. Após a reação, os produtos obtidos foram verificados em gel de agarose 1,5%,

purificados com o kit de purificação de PCR ExoSAP (Affymetrix) e enviados para sequenciamento das duas fitas (Macrogen, Coreia do Sul).

As sequências geradas apresentaram baixa qualidade. Foi verificada a existência de uma região de repetição da base adenina no interior das sequências, que pode levar a erros na atividade da polimerase. A fim de contornar este problema, a amplificação da região em questão foi realizada em duas reações de amplificação distintas.

A primeira reação utilizou os *primers* A e B (Taberlet *et al.*, 1991), em volume total de 25 μ L, composta por 20 ng de DNA, tampão-PCR 1X, $MgCl_2$ 6,0 mM, desoxinucleotídeos 125 μ M, *primers* 0,5 μ M, e 1U de *Taq* DNA Polimerase. A PCR foi programada para uma etapa a 94 °C por 2 min, 35 ciclos compostos por três etapas (94 °C por 1 min, 62 °C por 1 min e 72 °C por 2 min), seguidos por uma etapa final a 72 °C por 5 min.

A segunda reação foi realizada utilizando-se os *primers* C e D (Taberlet *et al.*, 1991), em um volume total de 25 μ L, contendo 20 ng de DNA, tampão-PCR 1X, $MgCl_2$ 1,0 mM, desoxinucleotídeos 200 μ M, *primers* 0,5 μ M, BSA (albumina sérica bovina) 0,7 μ g/ μ L e 1U de *Taq* DNA Polimerase. A PCR foi programada para uma etapa inicial a 95 °C por 5 min, 7 ciclos compostos por três etapas (94 °C por 1 min, temperatura de anelamento por 1 min, e 72 °C por 2 min, sendo a temperatura de anelamento de 58 °C para o primeiro ciclo, e decaindo 1 °C a cada ciclo, terminando em 52 °C), seguidos por 28 ciclos compostos por três etapas (94 °C por 1 min, 52 °C por 1 min e 72 °C por 2 min), e uma etapa final a 72 °C por 7 min.

Para a amplificação da região ITS dos genes nucleares de DNA ribossomal 18S-26S, foram utilizados os *primers* universais ITS4 e ITS5 (White *et al.*, 1990). A reação de amplificação foi realizada em volume total de 20 μ L, contendo 60 ng de DNA, $MgCl_2$ 3,75 mM, desoxinucleotídeos 250 μ M, *primers* 0,5 μ M, 1,25 μ L de DMSO, e 1,25 U de *Taq* DNA Polimerase. A PCR foi programada para uma etapa inicial a 94 °C por 4 min, 35 ciclos compostos por três etapas (94 °C por 1 min, 62 °C por 1 min e 72 °C por 45 seg), seguidos por uma etapa final a 72 °C por 5 min.

Para esta abordagem, foram adicionadas amostras de DNA de oito palmeiras de um Banco Ativo de Germoplasma, do Departamento de

Fitotecnia/UFV, cedidas pelo coordenador do banco Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike.

Os fragmentos gerados pelas três reações anteriores foram denominados, respectivamente, fragmento AB, fragmento CD e fragmento ITS. Estas regiões foram escolhidas por terem se mostrado informativas em trabalhos semelhantes, conforme Barros (2004) e Oliveira *et al.* (2010).

Os produtos de amplificação obtidos pelas três reações foram purificados com o kit de purificação de reação ExoSAP (Affymetrix) e enviados para sequenciamento das duas fitas na Macrogen (Coreia do Sul).

As sequências geradas foram importadas para o aplicativo computacional Sequencher versão 4.8 (Gene Codes Corporation), para serem editadas e corrigidas manualmente. A presença de *indels* foi compensada com a introdução de *gaps*, para realizar o alinhamento completo. Os *indels* foram considerados como um quinto caráter, e codificados de forma que cada *indel*, independente de seu tamanho, fosse considerado um evento único de mutação.

A rede de haplótipos foi construída através do aplicativo Network versão 4.6.1.1 (Fluxus Technology Ltd), através do método *Median Joining* (Bandelt *et al.*, 1999).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da estrutura genética populacional

Dos 25 *primers* ISSR analisados no presente trabalho, cinco apresentaram bandas reprodutíveis e polimórficas, com média de 2,2 locos polimórficos por *primer* (Tabela 3). Dentre os 36 pares de *primers* microssatélites utilizados, somente cinco amplificaram produtos polimórficos, com média de 4,4 alelos/loco (Tabela 4).

Tabela 3 – Sequência dos *primers* ISSR utilizados, com suas respectivas temperaturas de anelamento e número de locos polimórficos por *primer*.

Primer	Sequência	Temperatura de anelamento (°C)	Número de Locos polimórficos
UBC-810	GAGAGA GAG AGA GAG AT	55	2
UBC-824	TCT CTC TCT CTC TCT CG	53	4
UBC-835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC*	55	1
UBC-836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA*	55	3
UBC-848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG**	55	1

*Y (C,T); **R (A,G)

Tabela 4 – Pares de *primers* que amplificaram locos microssatélites polimórficos.

Loco	Acesso no Genbank	Sequência dos primers	Amplitude alélica (pb)	Tm (°C)	A	He	Ho	PIC
Aacu07	BV703504	F: ATCGAAGGCCCTCCAATACT R: GAAATAAGGGGACCCTCCAA	135-170	60	3	0,3573	0,1942	0,3075
Aacu10	BV703505	F: TGCCACATAGAGTGCTTGCT R: CTACCACATCCCCGTGAGTT	145-170	58	5	0,7016	0,2867	0,6507
Aacu12	BV703506	F: GAATGTGCGTGCTCAAAATG R: AATGCCAAGTGACCAAGTCC	170-195	58	4	0,4079	0,0629	0,3499
Aacu26	BV703508	F: ACTTGCAGCCCCATATTCAG R: GCAGGAACAGAGGCAAGTTC	250-280	56	5	0,3128	0,0091	0,2793
Aacu30	BV703509	F: TTGTGGAAGAAACAGGTCCC R: TCGCCTTGAGAAATTATGGC	70-260	52	5	0,5866	0,3473	0,5222
Média					4,4	0,4732	0,1801	0,4219

Tm: temperatura de anelamento; A: número de alelos; He: heterozigosidade esperada; Ho: heterozigosidade observada; PIC: índice do conteúdo de polimorfismo.

De acordo com a classificação de Botstein *et al.* (1980), os locos Aacu10 e Aacu30 se mostraram muito informativos, enquanto que os locos Aacu07, Aacu12 e Aacu26 se mostraram medianamente informativos. Em média, o PIC encontrado neste trabalho foi inferior ao encontrado por Nucci (2007), com relação aos cinco locos analisados. Entretanto, para os locos Aacu10 e Aacu30, os valores foram maiores (0,499 e 0,466, respectivamente). O número médio de alelos por loco também foi inferior. Apenas o loco Aacu026 apresentou maior número de alelos. Em relação aos valores de He e Ho, em média os valores encontrados foram menores aos relatados por Nucci (2007). Entretanto, para os locos Aacu10 e Aacu30, os valores encontrados foram superiores.

Na Tabela 5 é apresentada a análise da estrutura genética dos grupos estabelecidos de acordo com zoneamento agroecológico/econômico, a partir dos marcadores microssatélites.

Tabela 5 – Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade para 5 grupos de *A. aculeata*, com base em cinco locos microssatélites.

Grupo	N	Am	He	Ho	F	PIC
AP	24	3,6	0,4742	0,1341	0,7172	0,4198
NM	11	3,0	0,5190	0,2545	0,5096	0,4655
BH	11	2,8	0,4351	0,1273	0,7075	0,3874
NS	8	3,4	0,6275	0,3000	0,5219	0,5579
SM	10	2,6	0,3105	0,0844	0,7280	0,2789
Média	12,8	4,4	0,4732	0,1801	0,6368	0,4219

N: número de indivíduos; Am: número médio de alelos; He: heterozigosidade esperada; Ho: heterozigosidade observada; F: índice de fixação; PIC: conteúdo de informação polimórfica

A análise de agrupamento pelo método de Tocher levou à formação de 15 grupos (SSR), 11 grupos (ISSR) e 18 grupos (análise conjunta). Os grupos formados se encontram na Tabela 6.

Tabela 6 – grupos formados pelo método de Tocher, através de dados de marcadores SSR, ISSR, e da análise conjunta dos dois tipos de marcadores.

Grupos	SSR	ISSR	SSR + ISSR
1	AP02, AP03, AP03-1, AP04, AP05, AP05-1, AP07, AP12, AP14,	AP01, AP02, AP03, AP03_1, AP04, AP05, AP06, AP08, AP08_1, AP10, AP14, AP17, AP17_1, AP18, AP19, AP20, NM01, NM06, NM07, NM08, NM09, NM10, NM11, NM12, BH11, NS01, NS04, NS05, NS07, NS08, SM01, SM02, SM03, SM04, SM06, SM07, SM09, SM10.	AP02, AP03, AP03_1, AP04, AP05, AP06, AP07, AP14, AP20, BH01
2	AP08, AP08_1, AP10, AP15, AP16, AP17, AP18, AP19, AP20, NM01, NM02, NM03, NM10, BH01, BH04, BH05, BH09,	NM03, NM05, BH01, BH02, BH03, BH04, BH05, BH07, BH09, SM05, SM08	NM12, BH02, BH03, BH05, BH11, NS01, NS07, NS08, SM01, SM02, SM03, SM04, SM05, SM06, SM07, SM08, SM09
3	AP13, BH03, NS01, NS07, NS08, SM01, SM03, SM04, SM05, SM06, SM07, SM08, SM09	NS03, NS04	AP08, AP08_1, AP10, AP15, AP17, AP18, AP19, NM01, NM10,
4	NM06, BH02, BH11	AP09, AP11, AP15, AP16, NS06	NS03, NS04, NS05
5	NM05, NM09, BH07	BH08, BH10	NM03, BH04, BH07, BH09, BH10
6	AP11, BH06, BH08, BH10	AP05_1, AP07	NM05, NM09, NM11
7	AP01, SM10	AP12	NS02, SM10
8	NM11, NM12	BH06	BH06, BH08
9	NS03, NS04, NS05	AP13	AP11, AP17_1
10	AP09, AP17_1	NM04	AP12, AP16
11	NS02, SM02	NM02	AP01, AP05_1,
12	NS06		AP09
13	NM07		NS06
14	NM04		NM07
15	AP06		AP13
16			NM04
17			NM02
18			NM06

Observando os grupos formados por Tocher a partir dos dados dos marcadores SSR, vemos que os indivíduos da região de Alto Paranaíba foram divididos em sua grande maioria nos grupos 1 e 2. A maioria dos indivíduos da região do Sul de Minas Gerais e Noroeste de São Paulo foram agrupados no grupo 3. Os indivíduos das demais regiões apresentaram maior distribuição entre os grupos formados. Com base nos dados dos marcadores ISSR, 38 dos 64 indivíduos foram agrupados no grupo 1. Este fato deve ser provavelmente devido ao pequeno número de marcas utilizadas (11). No entanto, vemos que neste grupo estão 8 dos 10 indivíduos da região do Sul de Minas Gerais e Noroeste Paulista. Na análise conjunta dos dados de SSR e ISSR, novamente os indivíduos da região do Sul de Minas Gerais e Noroeste foram agrupados no mesmo grupo (2), com exceção do indivíduo SM10. As divergências entre os agrupamentos podem ser devido, em parte, ao pequeno número de marcas ISSR utilizadas no estudo.

Através da AMOVA (Tabela 7), foi possível verificar que a maior parte da variabilidade genética está contida dentro dos grupos, e uma menor parte se encontra entre grupos.

Tabela 7 – AMOVA gerada a partir dos dados de cinco marcadores SSR, 11 fragmentos ISSR e da análise conjunta dos dois tipos de marcadores.

FV	GL	SSR		ISSR		Conjunta	
		Estimativa	Porcentagem	Estimativa	Porcentagem	Estimativa	Porcentagem
Entre	4	0,3241	25,6264	0,2029	14,6657	0,7674	17,9659
Dentro	59	0,9407	74,3736	1,1806	85,3343	3,504	82,0341

5.2. Filogeografia molecular

Com base na qualidade das sequências ITS obtidas, foi possível utilizar nas análises um fragmento de 667 pb em 67 subamostras do Banco de Germoplasma. Verificou-se a existência de quatro sítios polimórficos, correspondendo a três transversões e uma inversão de bases. Dois destes sítios apresentaram ambiguidade (polimorfismo intragenômico).

Em relação ao espaçador *trnT-trnL*, o fragmento CD foi formado por 459 bp, totalizando 10 sequências analisadas. Entretanto, nenhum sítio

polimórfico foi encontrado. Para o fragmento AB, não foi possível realizar o correto alinhamento das sequências, devido à sua baixa qualidade. Foram gerados diversos fragmentos que não compartilham as mesmas sequências, e em alguns deles as sequências foram de baixa qualidade. Embora tenha sido possível alinhar várias sequências, gerando um fragmento da ordem de 800-900 pares de bases, uma região no interior deste fragmento apresentou sequenciamento de baixa qualidade na maioria destas sequências. Além disso, esta região aparenta ter sido alvo de várias inserções/deleções, fatos que impossibilitaram a determinação correta das sequências nesta região. Novos esforços devem ser empregados para a elucidação deste problema, pois o fragmento AB aparenta revelar maiores níveis de polimorfismo que os encontrados na região ITS.

Avaliando separadamente os dois locos do fragmento ITS que apresentaram ambiguidade, foram encontrados apenas dois haplótipos parentais. Deste modo, os indivíduos que apresentaram ambiguidade foram divididos em duas sequências (“a” e “b”), para que fosse calculada a rede de haplótipos. A Tabela 8 apresenta os quatro haplótipos gerados com seus respectivos indivíduos. A Figura 3 apresenta a rede de haplótipos, e a distribuição geográfica dos quatro haplótipos gerados.

Tabela 8 – Haplótipos formados a partir do fragmento ITS e indivíduos pertencentes aos haplótipos.

Haplótipo	Indivíduos	Nº Indivíduos
Hap_1	AP01a, AP02a, AP04a, AP05a, AP06a, AP07a, AP08a, AP08_1a, AP09a, AP10a, AP12, AP13a, AP14a, AP15a, AP16a, AP17a, AP17_1a, AP19a, AP20a, NM01, NM02, NM03, NM04, NM05, NM06, NM07, NM08a, NM10, NM11a, NM12a, NS01, NS02, NS03, NS04, NS05, NS06, NS07a, NS08a, SM09a, SM10a, SM11, SM12, SM13, SM14a, BH01, BH02, BH03, BH04, BH05, BH06, BH07, BH08, BH09, BH10, BH11, BAGCU, BAGMS17, BAGMS34, BAG016	59
Hap_2	AP01b, AP02b, AP03, AP03_1, AP04b, AP05b, AP05_1, AP06b, AP07b, AP08b, AP08_1b, AP09b, AP10b, AP13b, AP14b, AP15b, AP16b, AP17b, AP17_1b, AP18, AP19b, AP20b, NM08b, NM11b, NM12b, NS07b, NS08b, SM09b, SM10b, SM14b	30
Hap_3	BAGMS42, BAGMS48	2
Hap_4	BAGPARB, BAGPA	2

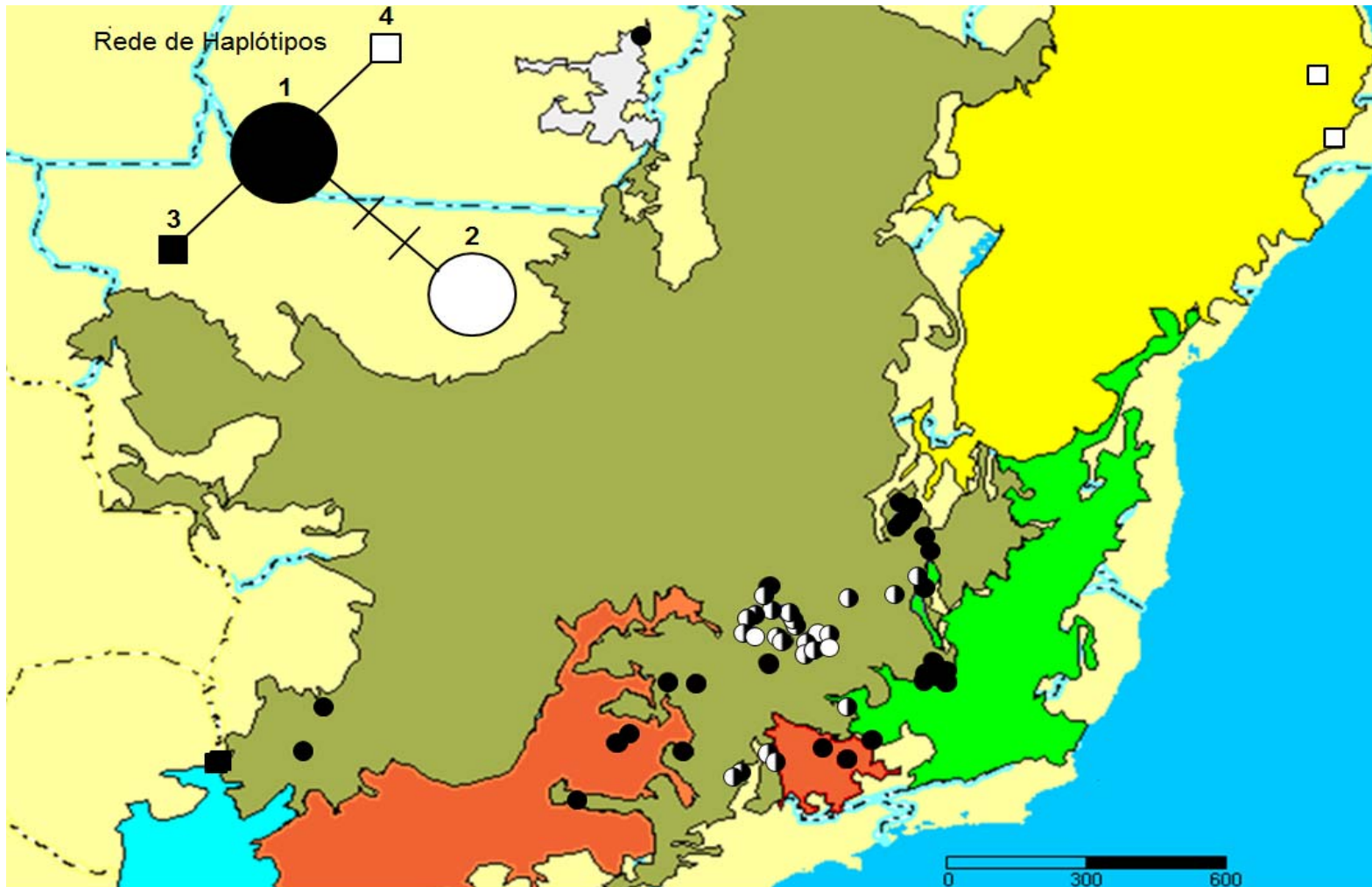


Figura 2 – Distribuição geográfica dos quatro haplótipos de *Acrocomia aculeata*, para a região ITS. Cada figura representa o haplótipo de um indivíduo, de acordo com a rede de haplótipos. Círculos preenchidos pela metade representam indivíduos com ambiguidade. As ecorregiões estão representadas na Figura 1.

Os 26 indivíduos que apresentaram ambiguidade estão distribuídos nas regiões do Alto Paranaíba, Norte de Minas Gerais, Sul de Minas Gerais e Nordeste de São Paulo. As regiões de Belo Horizonte, Triângulo Mineiro e Noroeste de São Paulo apresentaram o haplótipo 1. Apenas quatro indivíduos, localizados na região do Alto Paranaíba, apresentaram o haplótipo 2. O haplótipo 3 só foi encontrado em dois indivíduos localizados na divisa entre o Mato Grosso do Sul e o Paraguai, e o haplótipo 4 foi encontrado apenas nos indivíduos localizados na região Nordeste.

6. DISCUSSÃO

Os altos valores de F observados na Tabela 5 estão abaixo do esperado para espécies autógamas, e acima do esperado para espécies alógamas, confirmando que a espécie é de reprodução mista, conforme já sugerido por Nucci (2007) e Schincariol *et al.* (2008). Entretanto, o valor médio de F encontrado (0,6368) foi relativamente mais alto, se comparado com os trabalhos citados, que encontraram, respectivamente, valores médios de F iguais a 0,3490 e 0,4820. Tal fato pode ser explicado pela formação dos grupos, que provavelmente são representados por mais de uma população. A análise conjunta de populações com diferentes frequências alélicas pode levar ao aumento das estimativas de homozigotos e diminuição da heterozigosidade encontrada, produzindo valores de F superestimados. Este fenômeno foi primeiramente documentado por Wahlund em 1928.

Os resultados encontrados em AMOVA concordam com os encontrados por Oliveira *et al.* (2012), que analisaram a diversidade genética em populações de *A. aculeata* de cinco localidades na região do Norte de Minas Gerais, e encontraram 17,2% para a variabilidade entre, e 82,8% para a variabilidade dentro de populações.

Os menores valores de PIC encontrados neste trabalho para os cinco locos microssatélites, com relação aos encontrados por Nucci (2007) podem ser explicados com base nos resultados da AMOVA. Na área de estudo da autora, foram amostradas 47 palmeiras. No presente trabalho, apesar de o número total de indivíduos amostrados ser de 64, para a mesma área do trabalho de Nucci, foram amostrados apenas 18 indivíduos. Se a maior

porção da variabilidade genética se encontra dentro de grupos/populações, é esperado maiores valores de PIC para uma amostragem mais densa em uma mesma região, do que de uma amostragem menos densa, mas com abrangência de regiões, como neste trabalho. O mesmo raciocínio é válido para o menor número médio de alelos/loco encontrado neste trabalho, em relação ao trabalho de Nucci.

Comparando os agrupamentos formados a priori com os gerados por Tocher, apesar de provavelmente não representarem populações distintas, os agrupamentos realizados com base no zoneamento agroecológico/econômico estão associados com a estruturação genética existente para a espécie. De acordo com Nucci (2007), esta estruturação pode ser explicada pela antropização das regiões em que se encontram as populações amostradas, o que levaria a redução da variabilidade genética e do fluxo gênico entre as populações. Neste ponto, a deriva genética pode também ser fenômeno importante para a diferenciação das populações (Schincariol *et al.*, 2008).

O baixo conteúdo de polimorfismo encontrado no fragmento ITS sugere que a expansão de *A. aculeata* nas regiões amostradas foi recente. O padrão encontrado para a rede de haplótipos sugere concordância com a categoria V dos padrões filogeográfico de Avise *et al.* (1987). Neste padrão, linhagens comuns são amplamente encontradas em todas as regiões, enquanto que linhagens aparentadas estão confinadas a um ou poucos lugares. Isto implica em pequeno fluxo gênico contemporâneo entre populações que estiveram fortemente conectadas historicamente.

Trabalhos semelhantes, como os de Barros (2004) e Oliveira *et al.* (2010) mostraram que a região amplificada pelos *primers* C e D apresenta menores níveis de polimorfismo. Desse modo, o baixo nível de polimorfismo apresentado pelos outros fragmentos pode ser usado para justificar a inexistência de polimorfismo no fragmento CD.

Os haplótipos 3 e 4 se encontram em ecorregiões distintas dos demais (Chaco Úmido e Caatinga, respectivamente), e provavelmente compõe linhagens diferenciadas, mais adaptadas às condições onde elas se encontram. Ao mesmo tempo, estão situadas na região de ocorrência de duas outras espécies do gênero *Acrocomia*, *A. totai* e *A. intumescens*,

respectivamente (Reflora, 2013). A correta distinção entre estas espécies é muitas vezes dificultada. É possível que os indivíduos amostrados sejam pertencentes a estas espécies, ou que sejam espécimes de *A. aculeata* que estão ou estiveram em fluxo gênico com as mesmas.

Formam-se duas hipóteses para a existência dos indivíduos ambíguos. A primeira é de que o haplótipo 2 surgiu a partir de duas mutações ocorridas em indivíduos do haplótipo 1. Entretanto, seria esperado que um haplótipo intermediário entre esses dois fosse também encontrado na região. Este haplótipo pode não ter sido amostrado, ou já pode ter sido extinto. A segunda hipótese é de que o haplótipo 2 existe ou existia em outra região não amostrada no estudo, e que houve cruzamento entre indivíduos portadores destes haplótipos em algum local onde hoje ocorrem os indivíduos ambíguos.

Os resultados encontrados em AMOVA foram realizados com base em indivíduos dos estados de Minas Gerais e São Paulo. Entretanto, quando confrontados com a rede de haplótipos, podemos ver que, numa abordagem mais ampla, provavelmente teremos estimativas mais significativas da variabilidade genética entre as regiões de ocorrência dos quatro haplótipos. É admissível que a seleção natural, atuando de forma diferenciada nestes locais, fruto das diferentes condições edafoclimáticas características, aliada ao fluxo gênico dificultado pela grande distância física, foi provavelmente suficiente para que tenha ocorrido diferenciação entre as populações destas três regiões, ainda que a expansão da espécie tenha sido recente.

O baixo nível de polimorfismo encontrado para o fragmento ITS impossibilita a adoção de outras análises e abordagens filogeográficas, tais como testes de neutralidade e análise de *Mismatch distribution*, que são utilizadas para estimar e interpretar variações no tamanho efetivo das populações.

Para dar seguimento a este trabalho, é necessário expandir as coletas para as demais regiões de ocorrência de *A. aculeata*, e das espécies relacionadas (*A. intumescens* e *A. totai*), bem como uma amostragem mais refinada das regiões dos haplótipos 3 e 4. É também importante a realização de um trabalho de Filogenia, para que seja feita uma melhor definição dos limites entre as diferentes espécies do gênero *Acrocomia*.

Quando os padrões biogeográficos de ocupação da espécie em estudo são entendidos, melhores estratégias de captação da variabilidade genética podem ser definidas, visando a construção de um banco de germoplasma e o melhoramento genético da espécie. Os centros de diversificação das espécies são as regiões que abrigam os melhores sítios de coleta e norteiam os programas de coleta de germoplasma no mundo (Nass *et al.*, 2007). Do mesmo modo, a constatação de áreas de refúgio direciona a identificação de genótipos adaptados a condições ambientais específicas.

De posse destas informações, em conjunto com o histórico de coletas da espécie, os conhecimentos prévios de biologia de reprodução e os sistemas de amostragem para outros tipos de palmeiras tropicais, será possível maximizar a captação da variabilidade genética. Assim, a melhor escolha de genitores para cruzamentos, visando o melhoramento da espécie, poderá contribuir para a obtenção de maiores ganhos genéticos.

7. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente trabalho permitem concluir que:

- a) A espécie possui sistema reprodutivo misto;
- b) Existe variabilidade genética entre indivíduos de *Acrocomia aculeata* nos estados de Minas Gerais e São Paulo;
- c) A variabilidade genética é maior entre os grupos, de modo que coletas dentro destes grupos devem ser mais vantajosas que coletas em todos eles;
- d) A região de Minas Gerais e Norte de São Paulo apresenta pouca variabilidade para a região ITS dos genes de RNA ribossomal, abrigando 2 haplótipos, indicando ocupação recente.
- e) Quatro indivíduos abrigaram metade da variabilidade genética para a região ITS, indicando que regiões como Nordeste do Brasil e Mato Grosso do Sul devem ser foco de novos estudos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I. S.; CARVALHO, R. C.; CARVALHO, G. M. A.; MOTOIKE, S. Y. First karyotype, DNA C-value and AT/GC base composition of macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) – a promising plant for biodiesel production. **Australian Journal of Botany**, v. 59, p. 149-155, 2011.

ARAÚJO, F. D. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) – an economically valuable species of the Central Brazilian Cerrados. **Economy Botany**, v. 49, p. 40-48, 1995.

AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial dna bridge between population genetics and systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, v. 18, p. 489-522, 1987.

AVISE, J. C.; NELSON, W. S.; BOWEN, B. W.; WALKER, D. Phylogeography of colonially nesting seabirds, with special reference to global matrilineal patterns in the sooty tern. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1783-1792, 2000.

BALICK, M. J. Amazonian oil palms of promise: a survey. **Economic Botany**, v. 31, p. 11-28, 1979.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 37–48, 1999.

BARROS, W. S. **Filogeografia molecular de poaia [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes]**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa. 74p, Viçosa, 2004.

BELTRÃO, N. E. M. Agronegócio das oleaginosas no Brasil. **Informe Agropecuário**, v. 26, p. 14-17, 2005.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 33, p. 314-331, 1980.

CAMACHO, F. J.; LISTON, A. Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) based on Inter-simple sequence repeats (ISSR). **American Journal of Botany**, v. 88(6), 1065-1070, 2001.

CICONINI, G.; FAVARO, S. P.; ROSCOE, R.; MIRANDA, C. H. B.; TAPETI, C. F.; MIYAHIRA, M. A. M.; BEARARI, L.; GALVANI, F.; BORSATO, A. V.; COLNAGO, L. A.; NAKA, M. H. Biometry and oil contents of *Acrocomia aculeata* fruits from the Cerrados and Pantanal biomes in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 208-214, 2013.

COLE, D, M.; WHITE, T. L.; NAIR, P. K. R. Maintaining genetic resources of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth): The role of seed migration and swidden-fallow management in northeastern Peru. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, p. 189-204, 2007.

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

COLLEVATI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 1, p. 105-115, 2003.

CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; JUNQUEIRA, V. N. T.; LICURGO, L. M. S.; ANTONIASSI, R.; WILHELM, A. E.; BRAGA, M. F. Teor de óleo em frutos de

diferentes espécies de macaubeira (*Acrocomia* spp.). **Anais do XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura**, Bento Gonçalves, 2012.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: Diversidade Genética**. Editora UFV, 278p., Viçosa, 2008.

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

DUMOLIN-LAPÈGUE, S.; DEMESURE, B.; FINESCHI, S.; CORRE, V. L.; PETIT, R. J. Phylogeography structure of white oaks throughout the European continent. **Genetics**, v. 146, n. 4, p. 1475-1487, 1997.

ESTOPA, R. A.; SOUZA, A. M. de; MOURA, M. C.; BOTREL, M. C. G.; MENDONÇA, E. G.; CARVALHO, D. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Scientia Florestalis**, n. 70, p. 97-106, 2006.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of Molecular Variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.

FUTUYAMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. 2ª edição. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 631p, 2002.

GAIOTTO, F. A.; GRATTAPAGLIA, D. E.; VENCOVSKY, R. Genetic structure, mating system and long distance gene flow in Heart of Palm (*Euterpe edulis* Mart.). **Journal of Heredity**, Essex, v. 94, n. 5, p. 399-406, 2003.

GODWIN, I. D., AITKEN, E. A. B., SMITH, L. M.: Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. **P. Electroph**, v. 18, p. 1524-1528, 1997.

GOLDSTEIN, B. D.; SCHLOTTERER, C. **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford: Oxford University Press, p. 352, 2001.

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural forest populations. In: SCHONEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MAC BRYDE, B.; THOMAS, W.L. (Ed.). In: **Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations**. Menlo Park: Benjamin/Cummings. p. 335-348, Menlo Park, 1983.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. **Plant populations genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer, p. 43-63, 1989.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. **Field Guide to the Palms of the Americas**. New Jersey: Princeton University, Princeton, 1995.

JONES, B.; GLIDDON, C.; GOOD, J. E. G. The conservation of variation in geographically peripheral populations: *Lloydia serotina* (Liliaceae) in Britain. **Biological Conservation**. Essex, v. 101, p. 147-156, 2001.

LEMES, M. R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 2875-2883, 2003.

LESSIOS, H. A.; KESSING, B. D.; ROBERTONS, D. R.; PAULAY, G. Phylogeography of pantropical sea urchin *Eucidaris* in relation to land barriers and ocean currents. **Evolution**, v. 53, n. 3, p. 806-817, 1999.

LIMA, E. S.; FELFILI, J. M.; MARIMON, B. S.; SCARIOT, A. Diversidade, estrutura e distribuição espacial de palmeiras em um cerrado *sensu stricto*

no Brasil Central. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 3, p. 361-370, 2003.

LORENZI, G. M. A. C., **Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart. – Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável**. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná. 156p, Curitiba, 2006.

LORENZI, H.; SOUZA, H.; COSTA, J. T. M.; CERQUEIRA, L. S. C.; FERREIRA, E. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas no Brasil**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 432p, 2004.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L.; FOSTER, R. B. Population structure and mastling system in *Tachigali versicolor*, a monocarpic neotropical tree. **Heredity**, Essex, v. 81, p. 134-143, 1998.

MANFIO, C. E. **Análise Genética no Melhoramento da Macaúba**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 52p, Viçosa, 2010.

MDA – MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO. Mais 100 agricultores do Pará iniciam produção de matéria-prima para biodiesel, <<http://www.mda.gov.br/index.php?ctuid=10638&scid=134>>, (3 novembro 2006).

MOURA, E. F. **Embriogênese somática em macaúba: Indução, regeneração e caracterização anatômica**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa. 66p, Viçosa, 2007.

NASS, L. L. **Recursos Genéticos Vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 858p, Brasília, 2007.

NUCCI, M. S. **Desenvolvimento, caracterização e análise da utilidade de marcadores microssatélites em genética de população de macaúba**.

Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônômico de Campinas. 82p, Campinas, 2007.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 1143-1155, 2004.

OLIVEIRA, D. A.; JÚNIOR, A. F. M.; BRANDÃO, M. M.; RODRIGUES, L. A.; MENEZES, E. V.; FERREIRA, P. R. B. Genetic diversity in populations of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) in the northern region of Minas Gerais, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, p. 531-538, 2012.

OLIVEIRA, F. A. M. A produção de óleos vegetais de macaúba e seus co-produtos na região metropolitana de Belo Horizonte. In: **3º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, óleos, Gorduras e Biodiesel**, Varginha, 2006. CD-Rom.

OLIVEIRA, L. O.; ROSSI, A. A. B.; MARTINS, E. R.; BATISTA, F. R. C.; SILVA, R. S. Molecular phylogeography of *Carapichea ipecacuanha*, an amphitropical shrub that occurs in the understory of both semideciduous and evergreen forests. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 1410-1422, 2010.

OLSON, D. M.; DINERSTEIN, E.; WIKRAMANAYAKE, E. D. Terrestrial ecoregions of the world: a new map of life on earth. **BioScience**, v. 51, p. 933–938, 2001.

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas (6 volumes)**. Rio de Janeiro, IBDF, 1984.

Qiu, Y.-X.; Fu, C.-X.; Wu, F.-J. Analysis of population genetic structure and molecular identification of *Changium smyrnioides* and *Chuanminshen violaceum* with ISSR marker. **China J. Chin. Mat. Med.** V. 28, 598–603, 2003.

RANESES, A. R.; GLASER, L. K.; PRICE, J. M.; DUFFIELD, J. A. Potential biodiesel markets and their economic effects on the agricultural sector of the United States. **Industrial Crops and Products**, v. 9, p. 151-162, 1999.

REFLORA – Lista de Espécies da Flora do Brasil. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acessado em 28/02/2013.

ROSSI, A. A. B. Filogeografia, diferenciação geográfica e caracterização citogenética de populações naturais de *Psychotria ipecacuanha* das florestas Atlântica e Amazônica. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa. 122p, Viçosa, 2007.

SCARIOT, A.; LLERAS, E.; HAY, J. D. Reproductive biology of the palm *Acrocomia aculeata* in Central Brazil. **Biotropica**, v. 23, n. 1, p. 12-22, 1991.

SCARIOT, A.; LLERAS, E.; HAY, J. D. Flowering and fruiting phenologies of the palm *Acrocomia aculeata*: patterns and consequences. **Biotropica**, v. 27, n. 2, p. 168-173, 1995.

SCHAAL, B. A.; HAYWORTH, D. A.; OLSEN, K. M.; RAUSCHER, J. T.; SMITH, W. A. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 4, p. 465-474, 1998.

SCHINCARIOL, L. P.; PRIOLLI, R. H. G.; COLOMBO, C. A. Caracterização da estrutura genética populacional em macaúba (*Acrocomia aculeata*) por meio de marcadores microssatélites. **Anais do 2º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica-CIIC**, Campinas, 2008.

SILVA, J. C.; BARRICHELO, L. E. G.; BRITO, J. O. Endocarpos de babaçu e macaúba comparados à madeira de *Eucalyptus grandis* para produção de carvão vegetal. **IPEF**, v. 34, p. 31-34, 1986.

SPECIES LINK – Sistema de Informação Distribuído para Coleções Biológicas: A Integração do Species Analyst e do SinBiota (FAPESP).

Disponível em: <http://splink.cria.org.br>.<http://splink.cria.org.br/> Acessado em 23/01/2013.

TABERLET, P.; GIELLY, L.; PAUTOU, G.; BOUVET, J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Ecology**, v. 17, p. 1105-1109, 1991.

TEIXEIRA, L. C.; Potencialidades de oleaginosas para a produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**, v. 26, p. 18-27, 2005.

TEMPLETON, A. R. Statistical Phylogeography: methods of evaluation and minimizing inference errors. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 789-809, 2004.

THORPE, R. S.; MALHOTRA, A.; BLAC, H.; DALTRY, J. C.; WÜSTER, W. Relating geographic pattern to phylogenetic process. **Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B**, v. 349, p. 61-68. 1995.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocol: A Guide of Methods and Applications**, Academic Press, San Diego, p. 315-322, 1990.