

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE AMBIENTAL
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL

MARIA CAROLINA ROSSI BASTOS

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Euterpe edulis* Mart. EM ÁREA DE
RECUPERAÇÃO NO PARQUE ESTADUAL LAGO AZUL - PR**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2017

MARIA CAROLINA ROSSI BASTOS

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Euterpe edulis* Mart. EM ÁREA
DE RECUPERAÇÃO NO PARQUE ESTADUAL LAGO AZUL - PR**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental do Curso de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Raquel de Oliveira Bueno.

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Agenor Alves Bueno.

CAMPO MOURÃO

2017



TERMO DE APROVAÇÃO

VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Euterpe edulis* Mart. EM ÁREA DE RECUPERAÇÃO NO PARQUE ESTADUAL LAGO AZUL-PR

por

MARIA CAROLINA ROSSI BASTOS

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 28 de Novembro de 2017 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof. Dr Raquel de Oliveira Bueno

Prof. Dr. Paulo Agenor Alves Bueno

Prof. Dr. Débora Cristina de Souza

Prof. Dr. Edivando Vitor do Couto

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na coordenação do curso de Engenharia Ambiental.

AGRADECIMENTOS

Ao percorrer da minha trajetória na Universidade, inúmeras pessoas fizeram parte de muita partilha e cumplicidade. Certamente não irão caber todos nesses parágrafos. Portanto, desde já peço desculpas àquelas que não estão presentes entre essas palavras, mas podem estar certas que fazem parte do meu pensamento e de minha gratidão.

A todos os professores da coordenação de Engenharia Ambiental que se dispuseram no decorrer desses anos a passar todo conhecimento. Agradeço em especial aos meus orientadores Prof^a Dr^a Raquel de Oliveira Bueno e Prof^o Dr^o Paulo Agenor Alves Bueno, meu muitíssimo obrigado por me motivarem e me mostrarem que a persistência vale a pena, obrigada também pelos conselhos, contribuições e experiências não só profissionais, mas de vida.

Ao Instituto Ambiental do Paraná (IAP) e todos os funcionários do Parque Estadual Lago Azul (PELA) que colaboraram e permitiram que esse trabalho fosse realizado.

A Carolzinha e Yumi, pela paciência e disposição a me auxiliar nas análises e aprender os procedimentos para dar continuidade a este projeto tão especial.

A turma de Ambiental pelos momentos tão importantes que construíram essa jornada única. Muito obrigada pelos momentos incríveis que guardarei com muito carinho. Em especial a Aruani Tomoto, Amanda Medeiros e Rafael Carard, vocês estão presentes nas memórias mais especiais desses anos.

As minhas amigas-irmãs Ana e Mayara, obrigada pelo companheirismo, compaixão e compreensão em todos esses anos. Obrigada também por me mostrarem um lar em Campo Mourão.

As Marias: Michele, Leandro e Ricardo, muito obrigada por todo tempo e sentimento partilhado e aprendido com vocês. Levarei vocês pra vida.

A Mariana Carpinter, por todo companheirismo desde sempre.

Ao Andrei, obrigada pela compreensão, amor e companheirismo.

As mulheres da minha vida que sempre lutaram pela minha educação e sempre me inspiram em sua garra e determinação: Vó Cida, Tia Ieda e Madrinha Fátima. Obrigada por me inspirarem, me ajudarem e por serem grandes exemplos na minha formação de caráter.

Aos meus pais, Débora e José Otávio, por me incentivarem, apoiarem, amarem e serem meu alicerce, sem vocês não estaria aqui. Pai, mãe: Essa é pra vocês!

FIGURAS

Figura 1-Indivíduo de <i>Euterpe edulis</i> Mart.	13
Figura 2- Esquema dos ciclos das reações de PCR.	20
Figura 3- Esquema da técnica de eletroforese em gel de agarose.	21
Figura 4- Mapa de localização dos pontos de coleta no Parque Estadual Lago Azul em Campo Mourão, Paraná.	23
Figura 5- Croqui (A) de localização de três pontos amostrais no Parque Estadual Lago Azul, PELA.	25
Figura 6- - Croqui (B) de localização de três pontos amostrais no Parque Estadual Lago Azul, PELA.	26
Figura 7- Etapas da PCR no termociclador.	28
Figura 8- Corrida de eletroforese realizada em gel de agarose.	29
Figura 9- Gráfico da quantidade de <i>Locí</i> totais e PIC médio totais gerados para os seis pontos amostrados de <i>Euterpe edulis</i>	32
Figura 10- Relação de média total de PIC e quantidade de <i>Locí</i> totais nos seis pontos amostrais de <i>Euterpe edulis</i>	33
Figura 11- - Visualização em gel de agarose dos <i>primers</i> obtidos em produtos de PCR.	34
Figura 12- Dendograma de similaridade genética de Bray-Curtis entre os seis pontos amostrais de <i>Euterpe edulis</i> gerados a partir da matriz de distância Euclidiana, obtidos através de três marcadores moleculares, pelo método de agrupamento UPGMA.	38
Figura 13- Correlação entre distância geográfica (m) e distância genética entre os seis pontos amostrados de <i>Euterpe edulis</i>	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
3.1 CARACTERIZAÇÃO DE <i>Euterpe Edulis</i>	12
3.2 FRAGMENTAÇÃO DE HABITATS X DIVERSIDADE GENÉTICA	14
3.3 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR	16
3.3.1 Marcadores moleculares	16
3.3.2 Extração e amplificação de DNA.....	17
3.3.3 Técnica de PCR e Eletroforese	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 ÁREA DE ESTUDO.....	22
4.2 METODOLOGIA.....	23
4.2.1 Extração de DNA.....	27
4.2.4 Análise de Dados	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS.....	44
APÊNDICE A – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO PARA <i>EUTERPE EDULIS</i>	52

RESUMO

BASTOS, Maria C.R. **Variabilidade genética de *Euterpe edulis* Mart. em área de recuperação no Parque Estadual Lago Azul – PR.** 2017.52f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental) – Coordenação de Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* Campo Mourão – PR.

Três *primers* ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) foram utilizados para avaliar a variabilidade genética entre e dentro de populações de *Euterpe edulis* Mart. Foram analisados 88 indivíduos, distribuídos em seis pontos amostrais dentro de uma área de recuperação no Parque Estadual Lago Azul, Paraná. Todos os indivíduos foram submetidos a extração de DNA genômico pelo kit de extração da Invitrogen PureLink® Plant Total DNA Purification. 428 bandas foram amplificadas sendo apenas 143 polimórficas e 285 monomórficas. O *primer* ISSR14 demonstrou-se o mais informativo, anelando 88 indivíduos com 58,04% de bandas polimórficas. Os valores de PIC nos *primers* variaram de 0.05 a 0.29, sendo pouco informativos. Foi analisada a diversidade genética dos indivíduos de *E.edulis* nos seis pontos amostrais através do índice de heterozigosidade (0.14-0.21) e PIC (0.12-0.17). A AMOVA demonstrou que há maior variância genética dentro dos pontos (96.31%) do que entre os pontos amostrais (3.69%). O valor de F_{st} evidenciou um déficit de entrada de genes externos nos indivíduos amostrados (0.0435). A distância geográfica não teve caráter de diferenciação genética nos indivíduos estudados e demonstraram alta similaridade genética entre os pontos (0.888) através do dendograma de similaridade genética obtido pelo método de agrupamento UPGMA. Os resultados inferem que há pouca variabilidade genética entre os indivíduos estudados, o que pode ser oriundo de uma endogamia causada por um manejo mal realizado desses indivíduos. Esses resultados demonstram grande relevância, pois é um dos pioneiros na região a utilizar a ferramenta de biologia molecular para propor manejos mais adequados para *Euterpe edulis*.

Palavras chaves: Heterozigosidade. Marcadores Moleculares. Conservação.

1 INTRODUÇÃO

A fragmentação de habitats acontece em diversos biomas brasileiros ocasionando em perdas de fluxo gênico, migração, indivíduos e populações de espécies (GONÇALVES, 2006). Uma das consequências da fragmentação de habitats é a redução e subdivisão das populações, o que pode acarretar alterações de processos ecológicos e genéticos (FERREIRA, 2011). Além do aumento de cruzamentos endogâmicos e aumento da estrutura interpopulacional (YOUNG; BOYLE, 2000). Pode observar também mudanças no comportamento de polinizadores e dispersores (GONÇALVES, 2006).

Com o avanço da tecnologia é possível obter informações que mostrem os níveis de diversidade genética, bem como os processos que a mantém. Essas informações são fundamentais quando se deseja adotar medidas conservacionistas. Conhecer e entender como a diversidade genética está estruturada no espaço geográfico contribui para o entendimento sobre a história evolutiva e a dinâmica populacional da espécie (MELO, 2012). Entre os métodos encontrados para estudos genéticos e de evolução de plantas, o que obteve maior possibilidade de estudos em recursos genéticos na área da biologia molecular foram os marcadores de DNA que obtiveram rápidos avanços, demonstrando diversos procedimentos que geram informações de extrema relevância para programas de conservação genética e melhoramento florestal, onde já ocorre a formulação de estratégias genéticas e recomendações para a conservação da biodiversidade de diversas espécies arbóreas (ESTOPA et al., 2006).

O Brasil é considerado um dos maiores produtores e consumidores de palmito do mundo. Entretanto, sua produção é predominantemente extrativista e está baseada na exploração de espécies nativas (SANTOS; JÚNIOR; NEVES, 2008). Diversas palmeiras produzem palmito comestível no Brasil, sendo *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae) a mais conhecida, (MARTO, 2007). O alto valor econômico de *Euterpe edulis*, gera preocupação para preservação desta espécie, já que não apresenta rebrota após o corte para extração do palmito (MORTORA; VALERIANO, 2001). *Euterpe edulis* encontra-se na lista

vermelha do Centro Nacional de Conservação da Flora (2013) como uma espécie que enfrenta um risco de extinção elevado em quase todas as unidades federativas em que ocorre.

Euterpe edulis é uma espécie chave, com alta interação planta-animal, atraindo animais de grande porte e alta capacidade de dispersão. Sendo uma espécie muito utilizada em recuperação de áreas degradadas (REIS; ZAMBONIN; NAKAZONO, 1999).

O extrativismo descontrolado de determinadas espécies tem ocasionado um avançado estado de degradação nos biomas brasileiros. Atualmente é dado um novo enfoque quanto ao uso de seus recursos, considerando que a conservação de uma floresta não significa necessariamente mantê-la intacta, mas que os produtos florestais possam ser extraídos sem comprometer sua estrutura e função ecológica (MAFEI, 2004).

Deste modo, há grande necessidade de realização de estudos genéticos em populações naturais para que sejam feitas estratégias adequadas para conservação da diversidade genética, de uso e manejo adequado e diante da importância de *Euterpe edulis* e da necessidade de conhecimento no âmbito genético como ferramenta para preservação da espécie, este estudo objetivou verificar a variabilidade genética entre pontos amostrais de indivíduos de *E. edulis* no Parque Estadual Lago Azul, Paraná, em áreas de recuperação ambiental, utilizando marcadores moleculares, e com isso, fornecer informações para a conservação da espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a variabilidade genética de indivíduos de *Euterpe edulis* em área de recuperação dentro do Parque Estadual Lago Azul (PELA) Paraná, verificando a relação da distância genética com a distância geográfica desses indivíduos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar temperaturas de anelamento de *primers* ISSR's;
- Determinar a variabilidade genética em seis pontos de ocorrência de *E. edulis*, por meio de marcadores moleculares ISSR;
- Relacionar a distância genética de indivíduos de *E. edulis* com a distância geográfica em seis pontos no PELA.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 CARACTERIZAÇÃO DE *Euterpe Edulis*

Euterpe edulis (Figura 1) é uma palmeira pertencente à família Arecaceae, espécie endêmica do bioma Mata Atlântica. A espécie possui caule solitário ou muito raramente cespitoso, pode atingir em média 15 metros de altura e 15 cm de diâmetro (AGUIAR et al., 2002). Apresenta folhas pinadas, com pinas dispostas num mesmo plano, geralmente distribuídas ao longo da raque a intervalos irregular, sua inflorescência é abaixo do palmito (infracoliar). Espécie monoica com flores dispostas na mesma inflorescência, sendo no início protegida por uma folha modificada chamada espata (LORENZI et al., 2004). Suas flores são hermafroditas e a floração é anual e sazonal. A antese masculina libera todo o pólen em apenas um dia e a antese feminina mantém seu estigma receptivo por pelo menos dois dias, dificultando a autofecundação e favorecendo a reprodução cruzada (MANTOVANI; MORELLATO, 2000).

Figura 1-Indivíduo de *Euterpe edulis* Mart.



Fonte: Campestrini, 2011.

O palmito comestível de *Euterpe edulis* é retirado da extremidade superior do tronco (estipe) da palmeira. O palmito é formado por um tecido embrionário branco (meristema), envolvido pela parte basal e achatada das folhas jovens (bainhas), sendo responsável pelo crescimento da palmeira. Como essa espécie possui estipe único, portanto não forma touceira, a retirada do palmito causa a morte da planta (AGUIAR et al., 2002).

A estratégia reprodutiva de *Euterpe edulis* pode ser caracterizada como produção de frutos de pericarpo fino, investindo pouco em polpa, e estes sendo agrupados em grandes infrutescências, sendo muito atrativas para a fauna (CÔRTEZ, 2006). Estes frutos são dispersos por barocoria e/ou zoocoria, normalmente sinzoocoria pela regurgitação ou derrubada dos frutos pelos animais e também por endozoocoria (REIS, 1995). A polpa dos frutos carnosos

recobrando as sementes é nutritiva e constitui um recurso alimentar especialmente importante para os animais frugívoros. Estes animais podem estabelecer uma relação entre as plantas-mães e as novas gerações, devido a capacidade de regurgitarem, defecarem ou derrubarem as sementes intactas a uma distância mais afastada da planta mãe. As aves de grande porte como os tucanos e as jacutingas são consideradas dispersores efetivos do palmito, visto que são capazes de realizar essa relação, tanto de sementes oriundas de frutos pequenos quanto grandes (JORDANO, 1992 apud CÔRTEZ, 2006; GALETTI et al., 2013).

A palmeira é um produto florestal não madeireiro, de suma importância. Suas flores são polinizadas por inúmeros tipos de insetos, mas principalmente por abelhas e seus frutos, que são agrupados em grandes infrutescências, alimentam diversos animais, cerca de 30 espécies de aves (sabiás, jacus, tucanos, macucos) e outros pássaros que realizam a dispersão de sementes, 15 de mamíferos (morcegos, antas, queixadas, cachorros do mato, roedores) consomem os frutos de palmito (CASTRO, 2003). Seu meristema é apreciado por macaco prego, suas plântulas servem de alimento a catetos e queixadas. As sementes caídas no chão são devoradas por roedores como Cotias, Pacas, Ratos (CÔRTEZ, 2006; SIMON; BORCHARDT; BENEZ, 2012)

3.2 FRAGMENTAÇÃO DE HABITATS X DIVERSIDADE GENÉTICA

A Mata Atlântica cobria aproximadamente 15% do território brasileiro, no ano de 1500. Atualmente este Bioma está reduzido aproximadamente a 27% de sua área original, onde cerca de 7% são remanescentes florestais conservados, o restante é vegetação em estágio inicial e médio de regeneração. Esse cenário deve-se ao fato dos impactos da ocupação humana, que se tem acentuado nas últimas décadas, implicando em severas modificações no ecossistema, decorrente de fragmentações de habitats e perda da biodiversidade (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2007).

Neste panorama, as populações naturais de palmito reduziram de tamanho devido à intensa exploração dos recursos naturais e a fragmentação de habitats, que comprometem a dinâmica ecológica, isso contribuiu para a diminuição do número de indivíduos nas áreas de exploração, e em casos extremos houve a eliminação de populações inteiras (CONTE, 2004). Deste modo, foram impostas restrições legais à retirada do produto da floresta, mas os cortes clandestinos continuam, por falta de fiscalização e de incentivos para um adequado manejo da espécie (MARTINS-CORDER et al., 2009).

Os indivíduos de populações remanescentes de fragmentação florestal podem ter sua variação genética perdida, já que a população restante passa a ter menor quantidade de indivíduos que o mínimo adequado para sua normal continuidade e evolução (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2009). Nesta população pode ocorrer, em curto prazo, a erosão genética, que é a perda da diversidade genética em um local particular e num período particular de tempo, ou seja, perdas de algumas características em função da perda da variabilidade genética (perda de alelos em vários genes) e em longo prazo pode haver aumento da endogamia devido ao aumento da probabilidade de cruzamento de indivíduos aparentados (KAGEYAMA; GANDARA; SOUZA, 1998).

De modo, para mitigar essa situação são necessários estudos de variabilidade genética para obter conhecimentos de padrões ecológicos e genéticos para o embasamento de programas de conservação de espécies que estão apresentando perda de diversidade genética e risco de extinção. A manutenção da variabilidade genética em populações é o alicerce para que haja a conservação de espécies, assim, o conhecimento da sua descrição e distribuição é fundamental para elaboração de práticas conservacionistas efetivas (REIS et al., 2009).

3.3 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

3.3.1 Marcadores moleculares

A diversidade está ligada à variabilidade genética encontrada em uma espécie, sendo a heterozigiosidade a unidade para medi-la. A quantificação pode ser feita usando marcadores morfológicos, fisiológicos, bioquímicos ou moleculares (NEI, 1973).

Os marcadores moleculares são características do DNA que irão diferenciar dois ou mais indivíduos e que serão herdadas geneticamente (VIDOR et al., 2002). Marcadores moleculares estão dentro das técnicas de biologia molecular utilizadas para obter informações sobre os aspectos genéticos das espécies. Servem como ferramenta para descrever como estão distribuídas e descritas as variabilidades genéticas populacionais e intrapopulacionais (BERED; NETO; CARVALHO, 1997), além disso, aceleram a obtenção de genótipos desejáveis e podem estar ligadas a *locos* que determinam características de interesse, não são influenciadas por variações ambientais (FUGANTI et al., 2004). São de fácil operação, não exigem enzimas de restrições, sendo de grande utilidade nos estudos que visam determinar a distância genética entre parentais (SANTOS et al, 2013).

São diversos os marcadores moleculares existentes e estes se diferem em relação à metodologia aplicada a fim de se verificar a variabilidade genética das espécies. Atualmente os marcadores moleculares mais expressivos são classificados em dois grupos de acordo com a metodologia seguida para identifica-los. Desta forma temos os marcadores baseados em hibridização e baseados na amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction) de DNA. Os marcadores identificados por hibridização são os marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism). Já aqueles marcadores baseados em amplificação por PCR são os do tipo RAPD (Random Amplified Polymorfic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length 10 Polymorfism), Microsatélites ou

SSR (Simple Sequence Repeats) e ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) (FERREIRA, 2011; PRECZENHAK, 2013).

ISSRs são fragmentos de DNA de 100 a 3000pb amplificados via PCR usando um único primer (16-20pb) construído a partir de sequência de microssatélites. Para sua obtenção é necessário a extração e amplificação do DNA via PCR, eletroforese em géis de poliacrilamida ou agarose e visualização do polimorfismo por auto-radiografia, coloração com prata ou fluorescência (géis de poliacrilamida) ou por coloração com brometo de etídio sob luz ultravioleta (géis de agarose) (FALEIRO, 2007).

O método de ISSR é uma técnica simples, rápida, eficiente e apresenta alta reprodutibilidade além de gerar altos índices de polimorfismos. As vantagens deste método são a geração de grande número de bandas informativas por reação e o fato de não haver a necessidade de conhecimento prévio de dados de sequência de DNA para a construção do *primer* a ser utilizado (REDDY; SARLA; SIDDIQ; 2002). Assim sendo, essa técnica mostrou eficácia em análise de diversidade genética e mapeamento genético como demonstrou trabalhos realizados por Oliveira et al. (2013) utilizando marcadores ISSR para estimar diversidade genética entre acessos de *Capsicum* spp., e Lorenzoni et al., (2014) em estudos para avaliação da divergência genética de *Rollinia mucosa* [Jacq.] Baill. Tais estudos demonstram a eficiência na utilização desses marcadores na análise de variabilidade genética de espécies pouco estudadas demonstrando-se como uma ferramenta útil em programas de melhoramento e estudos de diversidade.

3.3.2 Extração e amplificação de DNA

Estudos de identificação e de caracterização da diversidade genética em plantas ocorrem por meio de técnicas moleculares, que envolvem a avaliação de um grande número de indivíduos, necessitando de metodologias rápidas e precisas na extração de DNA. A primeira etapa para utilização do DNA genômico nessas técnicas de biologia molecular se dá através da extração. Sua

pureza e qualidade são sempre os pré requisitos, pois, o co-isolamento de polissacarídeos, fenóis e compostos secundários são os principais problemas encontrados no isolamento e purificação de DNA vegetal. Deste modo, devem ser dissociados do DNA diversos componentes nucleares para que não hajam contaminantes que possam danificar o DNA e inibir a ação da enzima Taq polimerase (MOLINAR; CROCHEMORE, 2001; ARBI et al., 2009).

O modo para alcançar a pureza e qualidade na extração e isolamento de DNA, os protocolos de extração devem ser adequados à espécie de planta ou ao tecido vegetal em estudo (LIMA, 2008).

3.3.3 Técnica de PCR e Eletroforese

A reação de polimerase em cadeia (PCR) é uma técnica que envolve a síntese enzimática *in vitro* na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um *primer* que delimitam a sequência de DNA de dupla fita alvo da amplificação (FERREIRA; GRATTAPALIA, 1998). A sequência-alvo de DNA, cuja continuação é originalmente conhecida, é denominada DNA molde (FRUEHWIRTH; DELAI; FOLHA, 2015).

Os *primers*, são oligonucleotídeos de DNA ou RNA que hibridiza uma cadeia de DNA molde, fornecendo uma extremidade 3'-hidroxila livre para iniciar a síntese e amplificação de uma sequência de DNA pela DNA polimerase. Os *primers*, também chamados de iniciadores são amplamente empregados na biologia molecular para em reações de PCR para obtenção de marcadores moleculares do DNA (FALEIRO, 2007).

Para a execução da PCR se faz necessário a utilização de três segmentos de ácidos nucléicos: a dupla fita de DNA para servir de molde e a construção de dois oligonucleotídeos (*primers*), específicos de fita simples e complementares às duas fitas molde de DNA, desenhados de modo a flanquear a sequência a ser amplificada. A reação de PCR é preparada utilizando-se diversos reagentes que devem possuir concentrações específicas para todo tipo de análise e devem conter DNA polimerase, dNTPs, tampão e

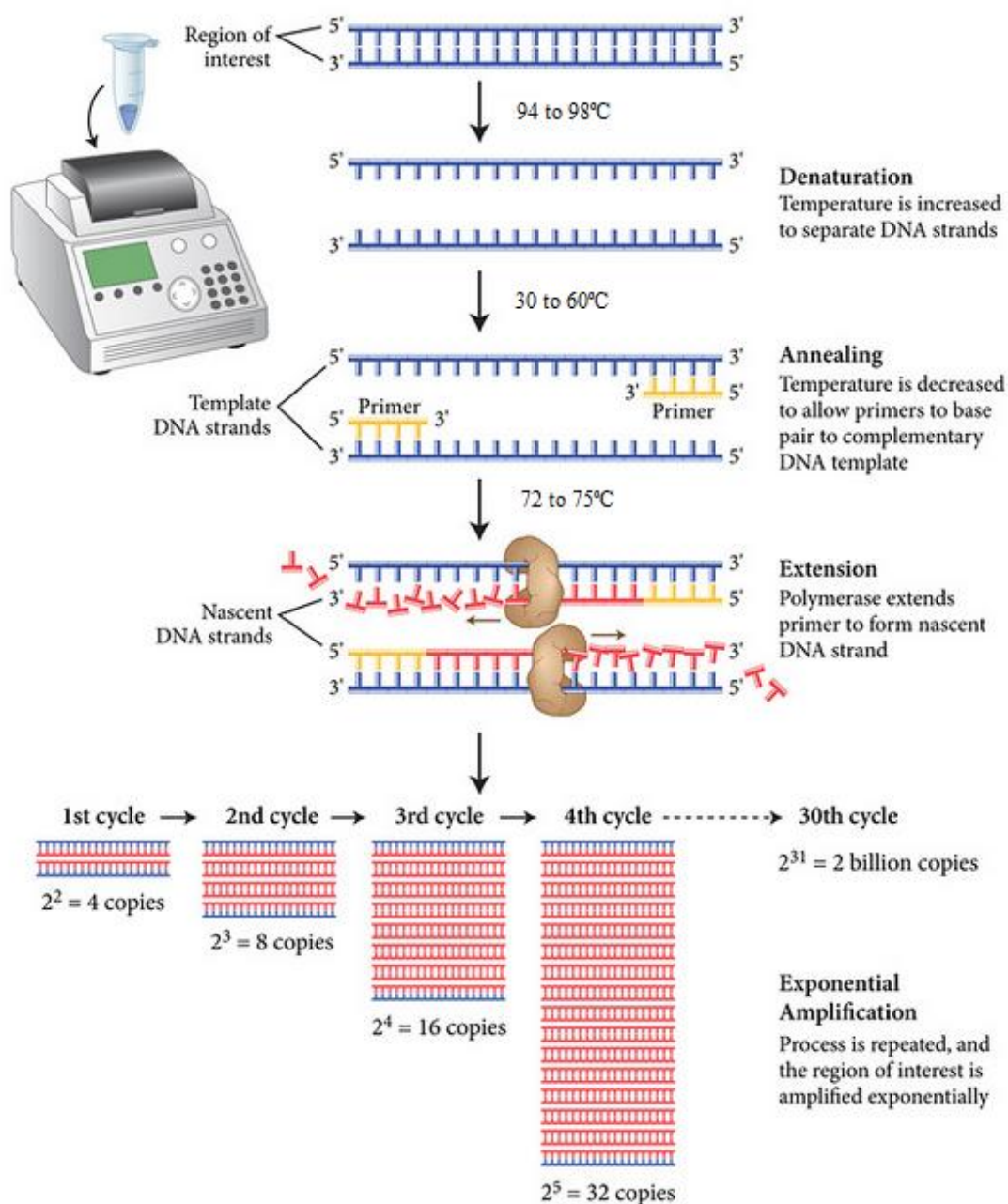
sais (MgCl) (LIMA, 2008). A técnica consiste de ciclos repetitivos, podendo resumi-los em 3 passos:

-1º passo (94-98°C) - Desnaturação do DNA a alta temperatura, devido ao rompimento das pontes de hidrogênio que unem as duas fitas.

-2º passo (30-60°C) - Anelamento dos *primers* em posições específicas (essa temperatura é definida em função da sequência nucleotídica dos *primers*).

-3º passo (72-75°C) - Extensão da sequência a ser amplificada pela ação da DNA polimerase. Durante cada ciclo, as fitas complementares de DNA são copiadas pela extensão dos *primers* que se anelam em posições opostas. Desta forma, cada fita de DNA recém amplificada é usada como molde no ciclo seguinte, resultando assim, no acúmulo exponencial do fragmento de DNA flanqueado pelos dois *primers* (LIMA, 2008). O demonstrativo dos ciclos bem como o acúmulo de DNA está demonstrado na figura 2.

Figura 2- Esquema dos ciclos das reações de PCR.

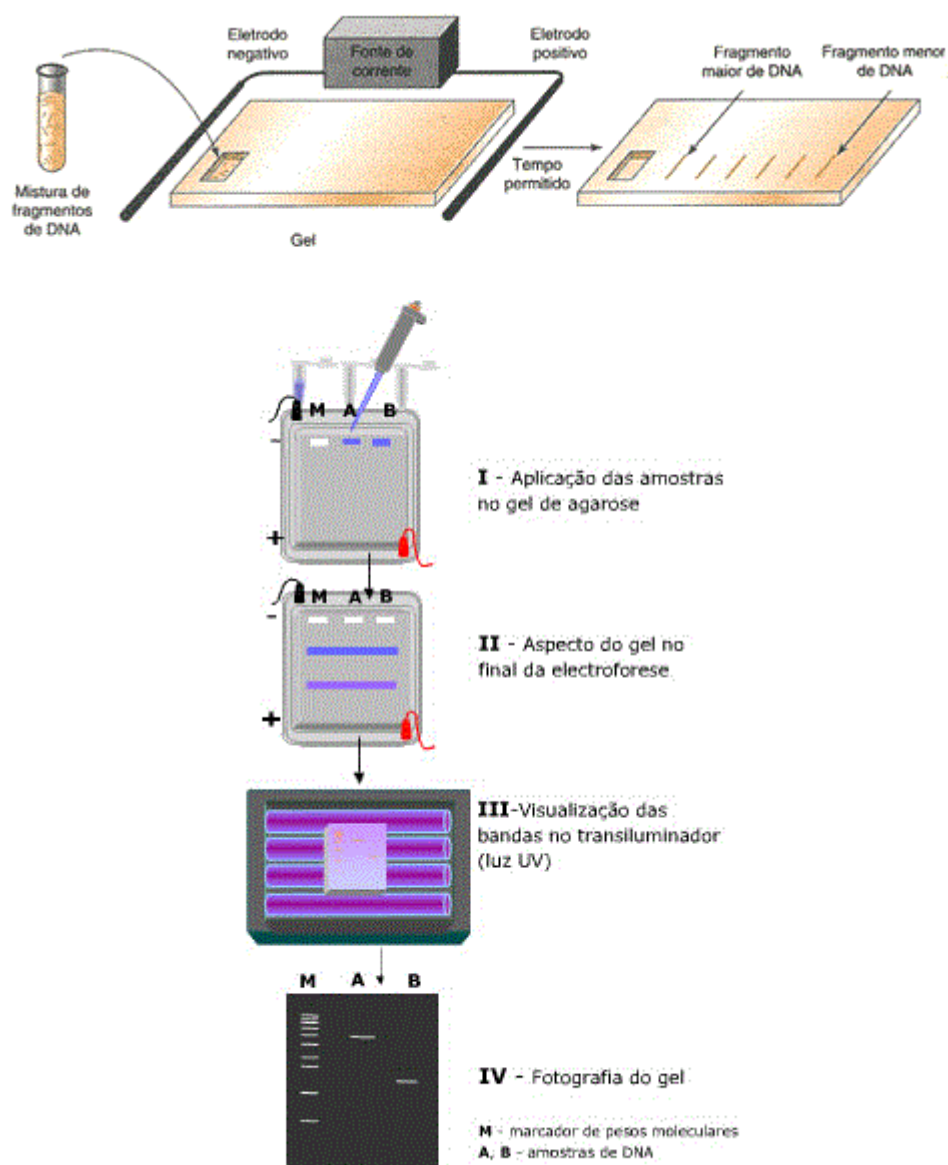


Fonte: Adaptado de NEB, 2017.

A interpretação dos resultados é dada pela diferença eletroforética das bandas, onde bandas posicionadas em locais distintos representam número díspar de pares de bases, obtidos através da eletroforese. A segregação dos marcadores é dependente de polimorfismo, portanto quanto mais alto grau de polimorfismo dos marcadores moleculares melhor a sua eficiência, refletindo em mais bandas que variam quanto à posição, por isso são ditas bandas polimórficas (HOFFMAN. BARROSO, 2006).

A eletroforese (Figura 3) é uma técnica que se baseia na carga negativa que a molécula de DNA possui quando submetida a valores de pH neutro ou alcalino. Deste modo, quando imerso em matriz de gel e submetido a um campo elétrico, migra em direção ao polo positivo. A velocidade desta migração irá depender do tamanho da molécula. Assim, moléculas de tamanhos diferentes irão se situar em diferentes pontos da matriz e serão localizadas no gel por meio de coloração por corantes adequados (CORRÊA; POSSIK, 2011).

Figura 3- Esquema da técnica de eletroforese em gel de agarose.



Fonte: Miranda, 2011.

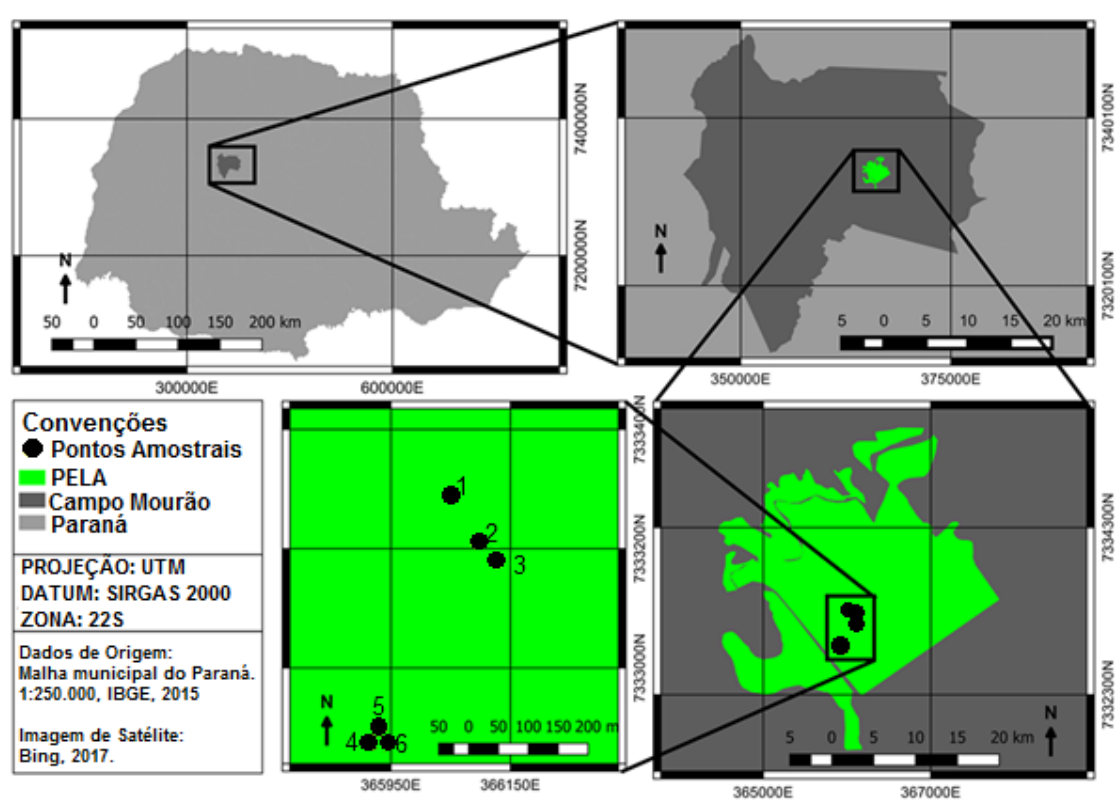
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

Este estudo foi realizado em uma área de recuperação no Parque Estadual Lago Azul (PELA) localizado nos municípios de Campo Mourão e Luiziana, no estado do Paraná (052°20'W e 024°04'S) (Figura 4). A área total do PELA é de 1.749 ha, com área de vegetação compreendendo a 670 ha, o restante correspondente ao reservatório da Usina Mourão, incorporado ao Parque. Há tendência de concentração das chuvas nos meses correspondentes à estação verão, sem estação seca definida. A temperatura média anual corresponde a 17,2 °C e os índices pluviométricos em torno de 1450 mm anuais (INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ, 2005). A cobertura vegetal nativa da região de Campo Mourão é formada por Floresta Estacional Semidecidual Montana, Floresta Ombrófila Mista Montana e áreas de transição entre as mesmas (RODERJAN et al., 2002), com pequenos fragmentos de Cerrado (HATSCHBACH; ZILLER 1995).

O parque conta com 10 zonas, onde cada uma apresenta um objetivo de manejo e norma específica. Destas, duas são zonas de recuperação, que compreende áreas alteradas pelo homem. É considerada provisória, pois uma vez restaurada, é incorporada a zona permanente. A zona de recuperação do PELA está dividida em duas zonas, zona de recuperação 1 e 2, a área de estudo deste trabalho está inserida na zona de recuperação 2 com 199.88ha. A zona de recuperação 2 compreende as áreas onde houveram a ação do fogo em tempos passados, as áreas de reflorestamento com espécies nativas e exóticas e áreas anteriormente impactadas que encontram-se em processo de regeneração natural (INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ, 2005)

Figura 4- Mapa de localização dos pontos de coleta no Parque Estadual Lago Azul em Campo Mourão, Paraná.



Fonte: Autoria Própria

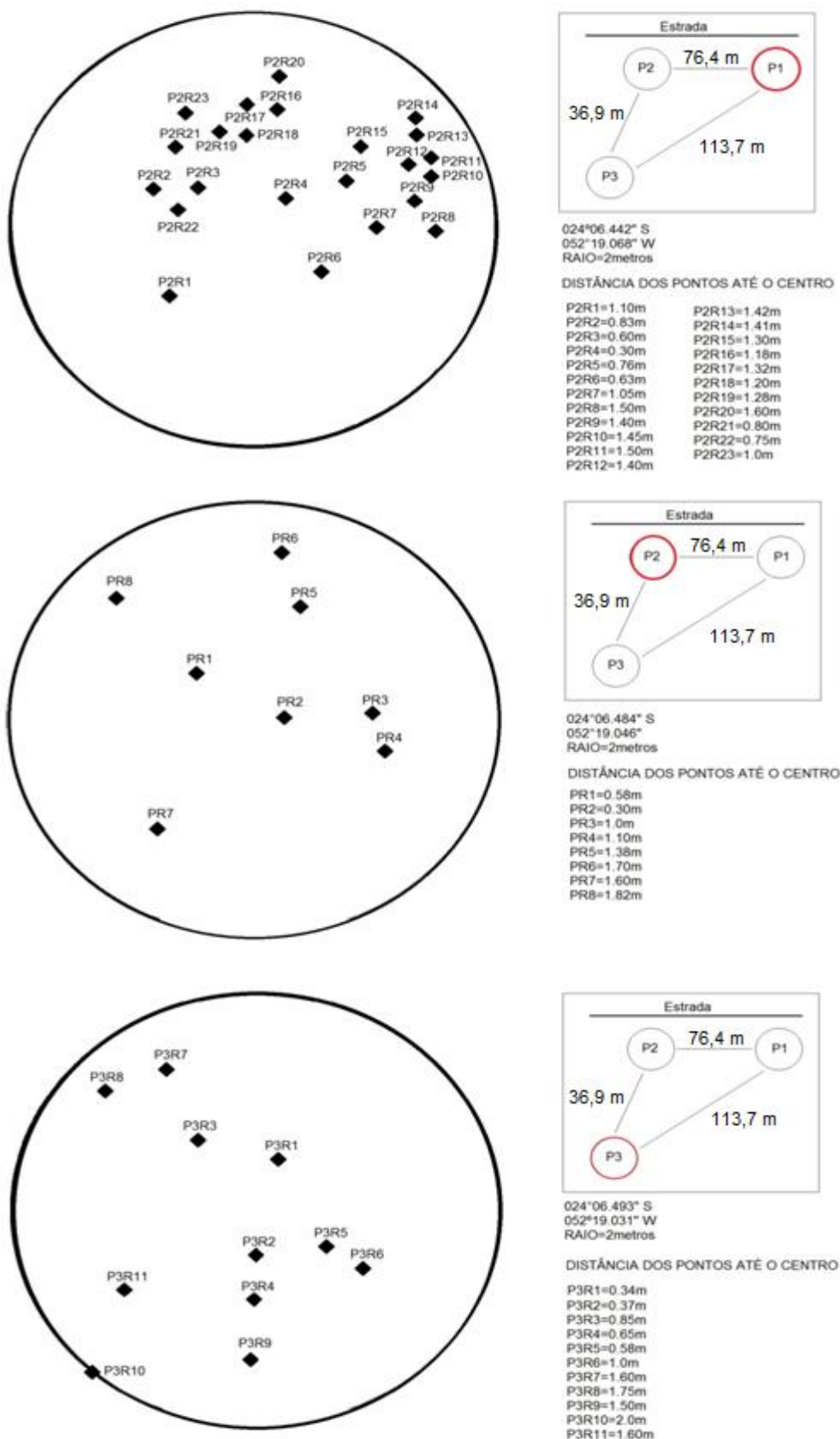
4.2 METODOLOGIA

As coletas em campo ocorreram em Outubro de 2016, em área de recuperação presentes no interior do perímetro do PELA (Figura 3). Dentro de cada área foram delimitados pontos de coleta, referenciados com auxílio de aparelho GPS (GARMIN® Etrex 10). Ao redor de cada ponto foi estabelecida uma área circular com raio de 2 metros, dentro do qual, todas as plântulas de *E. edulis* foram amostradas e a distância de cada uma em relação ao centro da circunferência foi registrada. Foram consideradas plântulas indivíduos de *E. edulis* com altura até um metro. Foram amostrados seis pontos, onde foram coletados 23, 8, 11, 22, 8 e 16 plântulas, totalizando 88 plântulas. A disposição espacial dessas plântulas e a coordenada geográfica de cada ponto amostral

estão demonstradas nas figuras 5 e 6. A distância entre os pontos foram medidas utilizando imagens de satélite do Google Earth®.

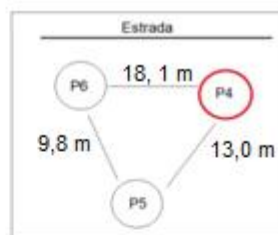
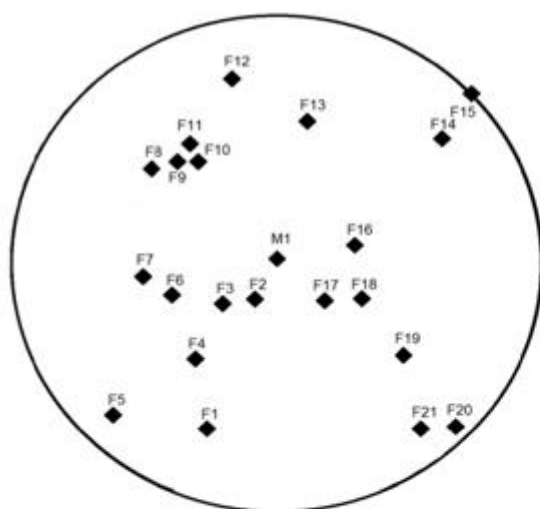
De cada plântula foram coletadas amostras de folhas mais jovens as quais foram devidamente identificadas e armazenadas em sacos plásticos contendo sílica gel, com a finalidade de retirar a umidade das folhas. Esse material botânico coletado foi encaminhado para o laboratório de Biologia Molecular da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, câmpus Campo Mourão e foi devidamente armazenado em *freezer* a -20°C .

Figura 5- Croqui (A) de localização de três pontos amostrais no Parque Estadual Lago Azul, PELA.



Fonte: Autoria própria.

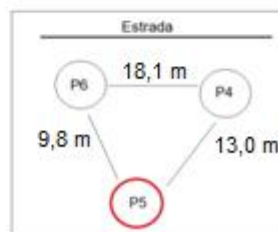
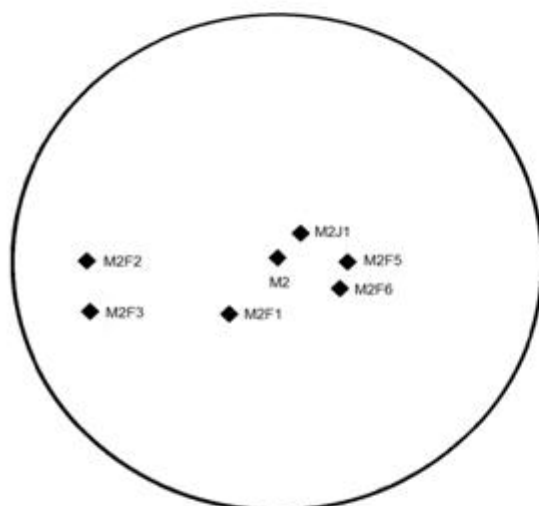
Figura 6- - Croqui (B) de localização de três pontos amostrais no Parque Estadual Lago Azul, PELA.



024°06.647" S
052°19.137" W
RAIO=2metros

DISTÂNCIA DOS PONTOS ATÉ O CENTRO

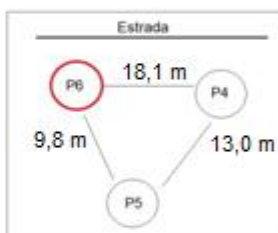
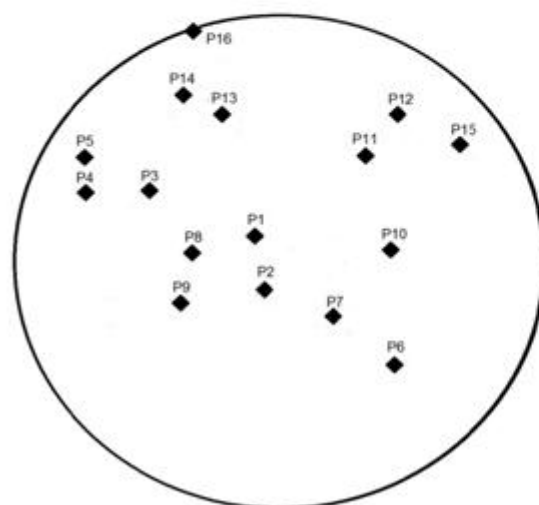
M1=0m	F11=1.25m
F1=1.70m	F12=1.67m
F2=0.50m	F13=1.25m
F3=0.60m	F14=1.80m
F4=1.17m	F15=2.0m
F5=1.90m	F16=0.65m
F6=0.75m	F17=0.60m
F7=1.0m	F18=0.70
F8=1.14m	F19=1.37m
F9=1.16m	F20=1.98m
F10=1.13m	F21=1.90



024°06.643" S
052°19.146" W
RAIO=2metros

DISTÂNCIA DOS PONTOS ATÉ O CENTRO

M2=0m
M2J1=0.01m
M2F1=0.46m
M2F2=1.40m
M2F3=1.40m
M2F4=1.78m
M2F5=1.0m
M2F6=1.36m



024°06.649" S
052°19.142" W
RAIO=2metros

DISTÂNCIA DOS PONTOS ATÉ O CENTRO

P1=0.34m	P9=0.66m
P2=0.48m	P10=0.75m
P3=0.45m	P11=1.40m
P4=0.66m	P12=1.45m
P5=0.79m	P13=1.0m
P6=0.97m	P14=1.10m
P7=0.80m	P15=1.80m
P8=0.53m	P16=2.0m

Fonte: Autoria própria.

4.2.1 Extração de DNA

Foi feita a extração do DNA de todas as plântulas coletadas utilizando o kit de extração da Invitrogen PureLink® Plant Total DNA Purification, que demonstrou maior eficiência na extração de DNA da espécie em comparação com o procedimento de extração adaptado de Doyle & Doyle (1987). O processo de extração do kit consiste em basicamente três partes: rompimento dos envoltórios das células vegetais, neutralização de compostos de DNA degradantes e separação de fase e isolamento, e purificação do DNA (FILHO, 2006). A descrição completa da extração do DNA genômico está apresentada no apêndice A.

4.2.3 Reações de PCR e Eletroforese

Para amplificação do DNA genômico foram utilizados três *primers* com a região alvo de sequência de nucleotídeos conhecidas. As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 25 µl, composto de 1µl de DNA, 3 µl *primer*, 2,5 µl Buffer 10x, 2,5µl dNTP 2,5mM, 0,75µl MgCl 50mM, 0,2 µl Taq. Polimerase e 15,05 µl ddH₂O em cada microtubo.

A PCR foi realizada em termociclador Long Gene ® modelo A3000, seguindo o protocolo ajustado com total de 40 ciclos, em três etapas: Desnaturação, Anelamento e Elongação. A desnaturação ocorreu a 94°C por 1 minuto; A fase de anelamento foi seguida de 40 ciclos de 94°C a 45 segundos e posteriormente efetuado um gradiente entre 50°C a 52°C de modo a ajustar a temperatura para cada *primer* à espécie, sendo testadas 11 temperaturas (Figura 7) por 45 segundos; e a etapa de alongação ocorreu a 72°C por 1 minuto. Ao final dos 40 ciclos, deu-se a finalização da PCR com a etapa de extensão final das reações, realizada a 72°C a 10 minutos.

Figura 7- Etapas da PCR no termociclador.

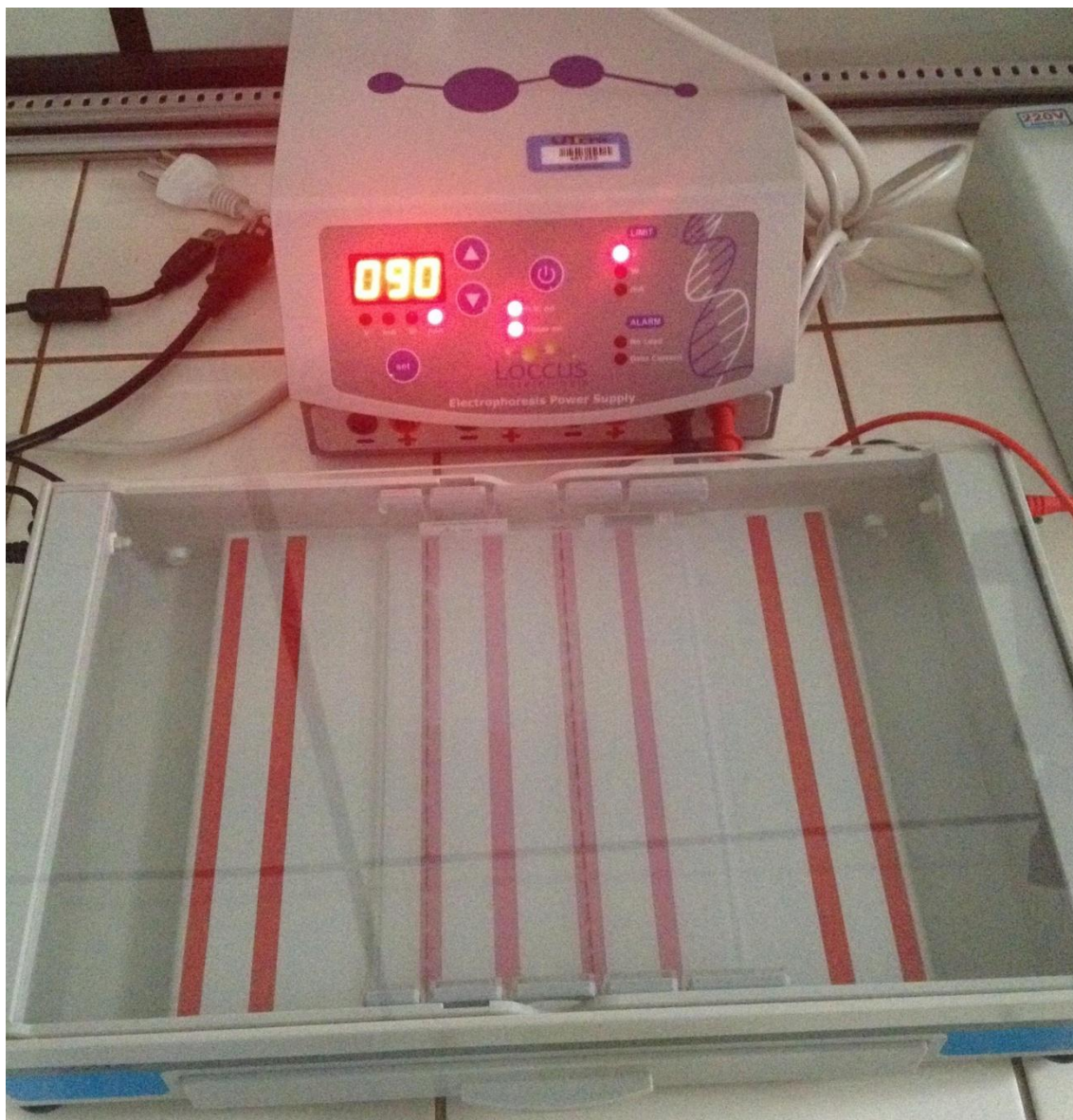


Legenda: A- Demonstração dos ciclos utilizados na PCR para *Eutерpe edulis*; B- Exemplo de gradiente utilizado durante incubação das amostras no termociclador para anelamento dos indivíduos.

Fonte: Autoria própria

Após a averiguação da temperatura de anelamento mais adequada de cada *primer* para a espécie, as amostras foram armazenadas em geladeira e identificadas para posterior realização da genotipagem dos indivíduos, que foi efetuada através de eletroforese em gel de agarose. Os produtos da amplificação foram separados por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose 1x (1,0 g de Agarose e 100 ml de TBE 0,5). O gel foi imerso em 300 ml de TBE 1x, em cuba LCH 13x15 da Loccus Biotecnologia® com os padrões de corrida de 110v, 120w, 400 mA a 90min. A aplicação das amostras de DNA foram previamente misturadas com 1µl de corante SYBR® Safe DNA gel para 3 µl de DNA, ressuspendidas e aplicadas nas cavidades no gel, realizadas com pentes durante a polimerização (Figura 8). A leitura do gel foi efetuada através do fotodocumentador L-PIX molecular imaging da Loccus Biotecnologia®, provido de transiluminador ultravioleta para captura de imagens. A leitura e ajuste da imagem foram realizados com auxílio do software L-PIX Image.

Figura 8- Corrida de eletroforese realizada em gel de agarose.



Fonte: Autoria própria.

4.2.4 Análise de Dados

O tamanho dos fragmentos de DNA obtidos foi comparado com ladder da Invitrogen® com 3000pb e os produtos amplificados foram avaliados em uma matriz de presença (1) ou ausência (0) de bandas. Para análise da imagem foi utilizado o programa Gel-Pro Analyzer 4.0.1 com parâmetros *default*.

Para medição da diversidade dos marcadores nos pontos amostrais utilizou-se os valores de Índice de Conteúdo Polimórfico (PIC) que é uma estimativa utilizada para a avaliação do poder discriminatório de um loco. A informatividade do loco P_i é a frequência do alelo p no loco P_i , calculado pela equação 1:

$$PIC = 1 - \sum_i p_i^2 \quad (1)$$

A informatividade do primer p_{ij} é a frequência do alelo p do loco i , no primer j (REZENDE et al.,2009) , sendo calculada pela equação 2:

$$PIC_{primer} = 1 - \sum_j \sum_i p_{ij}^2 \quad (2)$$

Também foi utilizado o índice de Heterozigosidade ambos calculados pelo programa GENES (CRUZ, 1997) Os valores do conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) e heterozigosidade (H) refletem a diversidade e a frequência alélica entre variedades, medindo a diversidade de cada marcador (COUTINHO; GUIMARÃES; VIDAL, 2014).

Para a estruturação genética e divisão da variância de seus componentes dentro e entre as populações, foi realizada a análise de variância molecular (AMOVA), por meio do programa GENES onde também foi gerado o teste de Mantel utilizado para testar a correlação entre a similaridade genética e distância geográfica (em metros) entre os pares de indivíduos dos pontos amostrais.

A representação das similaridades foi feita pela construção de dendrogramas para os pontos em estudo, com o auxílio do software PAST (HAMMER et al.,2001) , utilizando os índices de distância euclidiana obtidos através da matriz de ausência e presença. Os dendrogramas foram definidos pelo critério de agrupamento UPGMA (método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar a variabilidade genética de *Euterpe edulis* foram usados três *primers* ISSR para averiguar a informatividade destes marcadores à espécie testada, por meio de detecções e polimorfismo das bandas, também foi verificado o desempenho dos marcadores moleculares na eficácia de detectar o nível de polimorfismo e diversidade genética nos pontos amostrais. Todos os indivíduos foram testados com os três *primers* (iniciadores) de sequências de nucleotídeos conhecidos: ISSR04, ISSR10 e ISSR14. Cada *primer* foi submetido a um gradiente de temperatura, onde as temperaturas mais adequadas ocorreram em torno de 49°-55°C (Tabela1) os *primers* ISSR04 e ISSR14 obtiveram temperaturas de anelamento constante enquanto o *primer* ISSR10 obteve temperaturas variáveis entre 50°-52°C.

Tabela 1- *Primers* utilizados, sequência de nucleotídeos conhecidos de cada *primer*, temperatura de anelamento dos indivíduos referentes a cada *primer*, quantidade de indivíduos anelados e número de bandas obtidas.

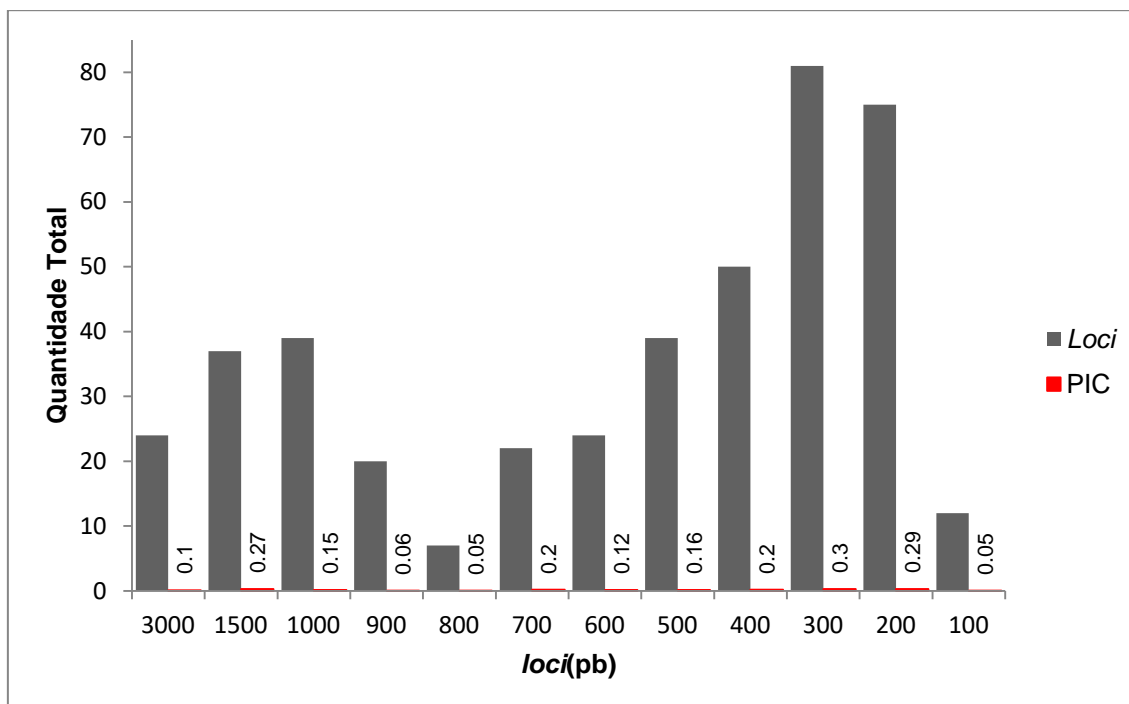
<i>Primers</i>	Sequência de nucleotídeos	T° de anelamento	Qnt de indivíduos testados	Qnt de Indivíduos anelados	N. de Bandas Obtidas	P%
ISSR04	(GACA) ₄	54.8°	88	85	188	39,16%
ISSR10	(CTC) ₆	50°-52°	88	28	50	02.80%
ISSR14	(AC) ₈ CT	49.5°	88	88	190	58.04%

P%- Percentagem de polimorfismo do *primer*.

Fonte: Autoria própria

Os iniciadores utilizados apresentaram 12 *loci* (3000-100pb), sendo mais abundantes para *E. edulis* os *loci* 300 e 200pb (Figura 9). Os valores médios do conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada *loci* demonstram que a diversidade e a frequência alélica desses marcadores são baixas, apresentando no máximo 0.30 de PIC no *loco* 300 e o valor mínimo de 0.005 de PIC para o *loco* 800.

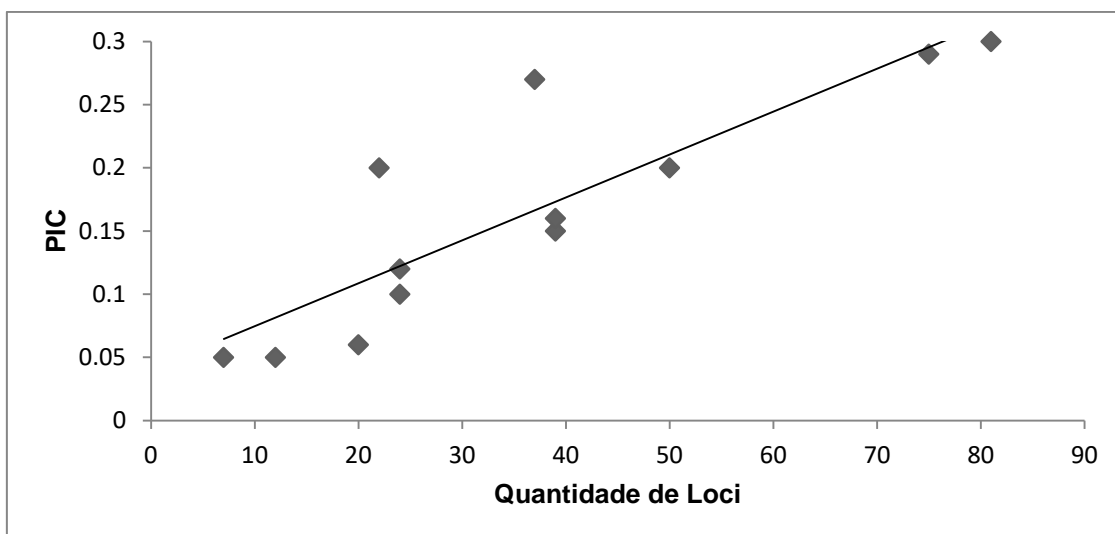
Figura 9- Gráfico da quantidade de *Loci* totais e PIC médio totais gerados para os seis pontos amostrados de *Euterpe edulis*.



Fonte: Autoria própria

Pode-se associar que há uma relação entre PIC e a quantidade de *Loci*, que estão diretamente ligados a questão de monomorfismo e polimorfismo, onde os menores valores de PIC estão relacionados com os menores valores da frequência de *locus* (Figura 10). Isso geralmente ocorre, pois ao se tratar de representatividade amostral e acurácia na detecção de variabilidade essa relação é usual. Então, quanto mais frequentes os *loci* mais chances de serem polimórficos e resultarem assim numa mais acurada explicação da variabilidade genética populacional. Ao passo que *loci* pouco frequentes tendem a serem menos polimórficos por serem mais raros (HOFFMAN; BARROSO, 2006).

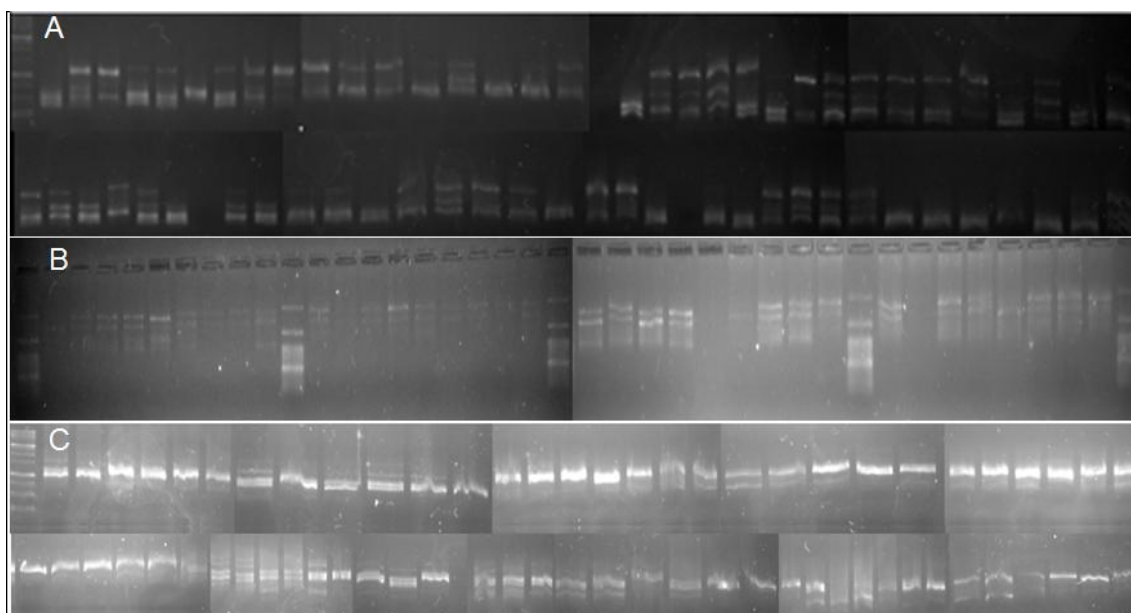
Figura 10- Relação de média total de PIC e quantidade de *Loci* totais nos seis pontos amostrais de *Euterpe edulis*.



Fonte: Autoria própria

Dos 88 indivíduos testados para os três iniciadores, ocorreram anelamentos em 85 indivíduos para ISSR04, 28 indivíduos para ISSR10 e 88 indivíduos para ISSR14, gerando um total de 428 bandas para todos os pontos amostrados. O gel representativo da amplificação dessas bandas, por *primer*, está demonstrado na figura 6. Das bandas geradas apenas 143 foram polimórficas e 285 monomórficas, onde as polimórficas variaram de 2,80% (04 bandas) para o *primer* ISSR10, 39,16% (56 bandas) para o *primer* ISSR04 e 58,04% (83 bandas) para o *primer* ISSR14. A frequência de polimorfismo dos iniciadores demonstra que esses *primers* foram pouco informativos para *E. edulis*. O *primer* ISSR 14 foi o que apresentou maior efetividade entre os três iniciadores testados (Figura 11).

Figura 11- - Visualização em gel de agarose dos primers obtidos em produtos de PCR.



Legenda: A- Eletroforese do *primer* ISSR04; B- Eletroforese do *primer* ISSR10; C- Eletroforese do *primer* ISSR14.

Fonte: Autoria própria

Apesar da pouca informatividade dos *primers*, as bandas obtidas a partir da amplificação dos iniciadores foram utilizadas para obter informações sobre a diversidade genética dos indivíduos de *E. edulis* nos pontos amostrais. Os valores da média de conteúdo de informação de polimorfismo dentro dos pontos amostrais mostraram-se pouco variáveis, ficando entre 0.12- 0.17, onde o ponto amostral P2 obteve a maior média de PIC (0.17) e o ponto P6 a menor média (0.12) (Tabela2). Os valores de PIC variam de zero (monomórficos) a um (altamente discriminativo, com vários alelos). Conforme a classificação de BOLSTEIN et al. (1980) onde, os valores de PIC, são considerados muito informativos (>0,5), mediamente informativo (0,25-0,5) e pouco informativo (<0,5), pode-se observar que os valores determinados de PIC demonstram baixa distribuição dos alelos dentro dos pontos amostrais, inferindo que estes indivíduos apresentam alto grau de monomorfismo. Gravitol et al. (2010) afirmam que a eficiência de um sistema de marcador molecular pode ser medida pela quantidade de polimorfismo que pode ser detectado.

Os valores médios de Heterozigosidade encontrados dentro dos pontos foram relativamente baixos, variando de 0.14-0.21, sendo considerados pouco informativos, já que para serem bastante informativos os valores de

heterozigosidade devem ser maiores que 70% (FERRO, 2011). A baixa taxa de heterozigosidade aferida nos pontos amostrais pode ser determinada pelo alto índice de parentesco entre as amostras. A endogamia por sua vez, promove a perda da adaptabilidade e diminui a sobrevivência das progênes, promove uma maior sensibilidade a variações ambientais e eventualmente pode provocar a extinção da espécie (POVH et al., 2008). Vários estudos realizados com marcador ISSR têm demonstrado a eficiência desse marcador em análises da variabilidade genética em populações vegetais (ALMEIDA et al., 2009; BRANDÃO, 2008; CIDADE, 2009; SOUZA et al. 2008, GIUSTINA et al., 2014; RIVAS et al., 2013; ROSSI et al., 2009).

O crescente interesse comercial por *E.edulis* bem como a fragmentação dos habitats tem contribuído para a redução das populações e conseqüentemente predispondo a espécie ao risco de perda de variabilidade genética. O problema da exploração predatória desta espécie pode provocar a erosão genética (BOVI et al., 1991) além de redução no tamanho efetivo populacional, mudanças no padrão de distribuição espacial, no comportamento de polinizadores e dispersores de sementes, na taxa de cruzamento entre outras (LOVELESS; HAMRICK, 1984; YOUNG et al., 1996) todos esse fatores podem afetar a estrutura genética das populações e, como conseqüências, trazer a perda de alelos raros, redução da heterozigosidade e aumento da endogamia (ROSSI et al., 2014).

Tabela 2- Tamanho total de indivíduos nos pontos amostrais, PIC e H de cada ponto amostral de *Euterpe edulis*.

Pontos amostrais	N	PIC	H
P1	61	0.14	0.16
P2	19	0.17	0.21
P3	26	0.14	0.16
P4	44	0.13	0.16
P5	16	0.13	0.15
P6	35	0.12	0.14

N- Tamanho da amostra; PIC- Média de Conteúdo da informação de polimorfismo; H- Média do Índice de heterozigose;

Fonte: Autoria própria

A análise de variância molecular (AMOVA) dos seis pontos amostrais mostrou que a maior parte da variação genética se encontra dentro dos pontos amostrais (96.31%), sendo apenas 3.69% da variação genética entre os pontos amostrais (Tabela 3). Estimou-se o valor de diferenciação genética (F_{st}), que representa um índice de diferenciação genética da população e determina as proporções da variabilidade genética total que se referem às diferenças genéticas entre populações e às diferenças entre indivíduos (MORK, 2000). Dessa forma, F_{st} é a estatística informativa para examinar o nível total de divergência genética entre subpopulações (HARTL; CLARK, 2010). Teoricamente, os valores de F_{ST} podem variar de 0 (nenhuma divergência genética) a 1 (fixação de alelos). No entanto, o valor observado é muito menor do que 1. Wright (1965) sugeriu os seguintes valores como orientação para a interpretação de F_{ST} : 0 a 0,05 (pequena diferenciação genética), 0,05 a 0,15 (moderada diferenciação genética), 0,15 a 0,25 (grande diferenciação genética) e acima de 0,25 (diferenciação genética muito grande).

O fato de existir maior variabilidade genética dentro dos pontos do que entre os pontos pode estar relacionado ao tamanho efetivo populacional de *E. edulis*, onde a estratégia reprodutiva desta espécie envolve a manutenção de um grande banco de plântulas, com média de 12.000 plântulas por hectare (REIS et al., 1996). A área de coleta deste estudo foi pouco ampla podendo ter contribuições de banco de plântulas de outros indivíduos de *E. edulis* que ocorrem no local e que não foram coletados já que neste trabalho foram amostradas somente as plântulas desta espécie.

Os resultados obtidos dos *primers* foram usados para estimar a distância genética entre os seis pontos amostrais. Os resultados obtidos das distâncias genéticas foram utilizados para elaboração do dendograma de similaridade genética gerada a partir da relação genética dos indivíduos entre os pontos amostrais baseados nos cluster UPGMA da matriz de distância euclidiana (Figura 12). O dendograma gerado reforça o quadro da maior variância dentro dos pontos do que entre, quando analisado observa-se a formação de dois principais grupos que apresentam alta similaridade com aproximadamente 0.888. O índice de similaridade de Bray-Curtis, quanto maior

o valor do coeficiente observado, mais parecidos são os indivíduos demonstrando que o produto das análises com os três iniciadores para os seis pontos amostrais apresentam baixa variância genética, ou seja, são indivíduos com alta similaridade entre si.

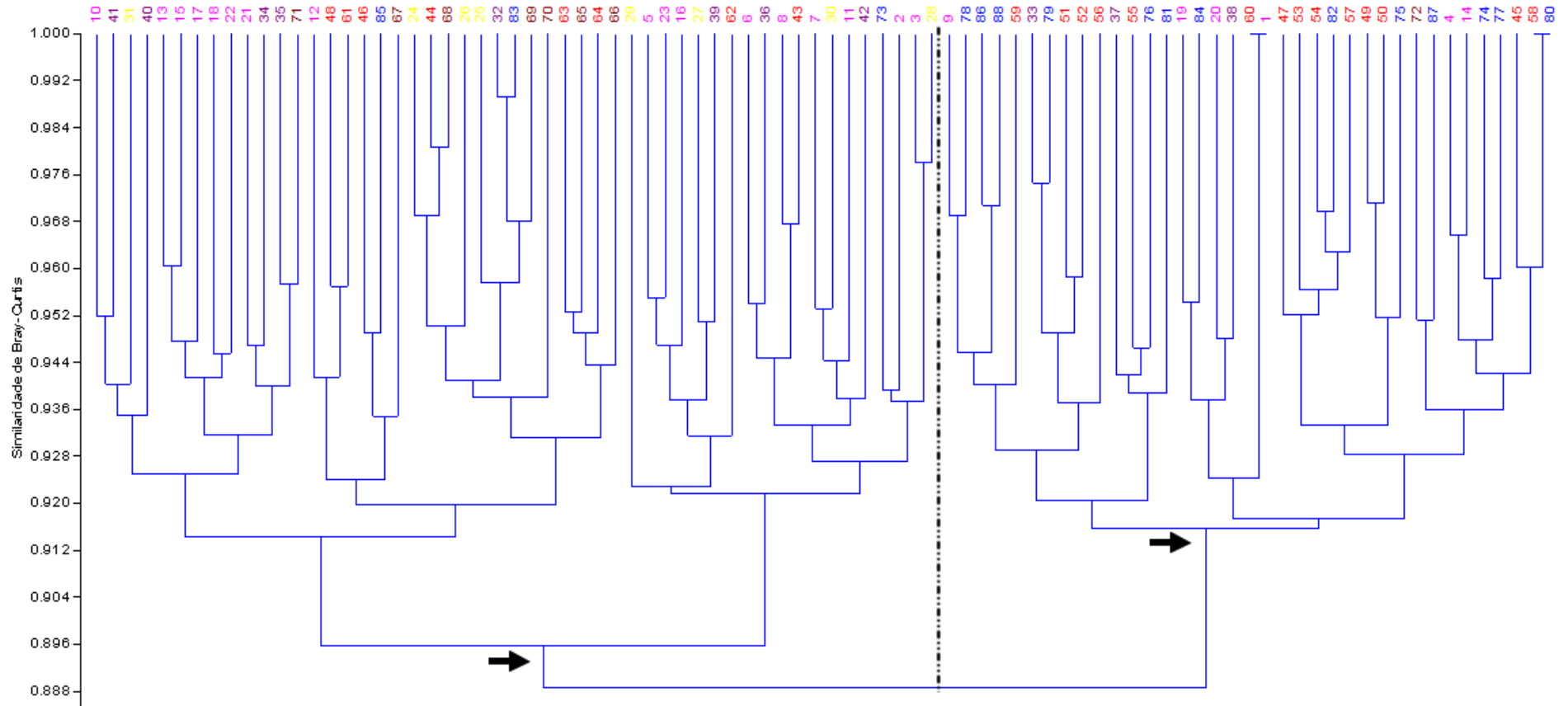
Tabela 3- Valores de GL, estimativa da variação genética, p e Fst entre e dentro dos seis pontos amostrais, obtidos pelo teste da AMOVA .

Fonte de Variação	GL*	Estimativa	VT(%)*	Valor de p
Entre pontos	5	0.0593	3.69	n.s
Dentro dos pontos	195	1.5487	96,31%	n.s

*Grau de Liberdade (GL), Porcentagem da Estimativa da variação genética, Variância Total (VT) e Probabilidades de ter um componente de variância maior que os valores observados ao acaso (P). As probabilidades foram calculadas por 1.000 permutações ao acaso. Fst=0.0435

Fonte: Adaptado de ROSSI et al., (2014).

Figura 12- Dendrograma de similaridade genética de Bray-Curtis entre os seis pontos amostrais de *Euterpe edulis* gerados a partir da matriz de distância Euclidiana, obtidos através de três marcadores moleculares, pelo método de agrupamento UPGMA.

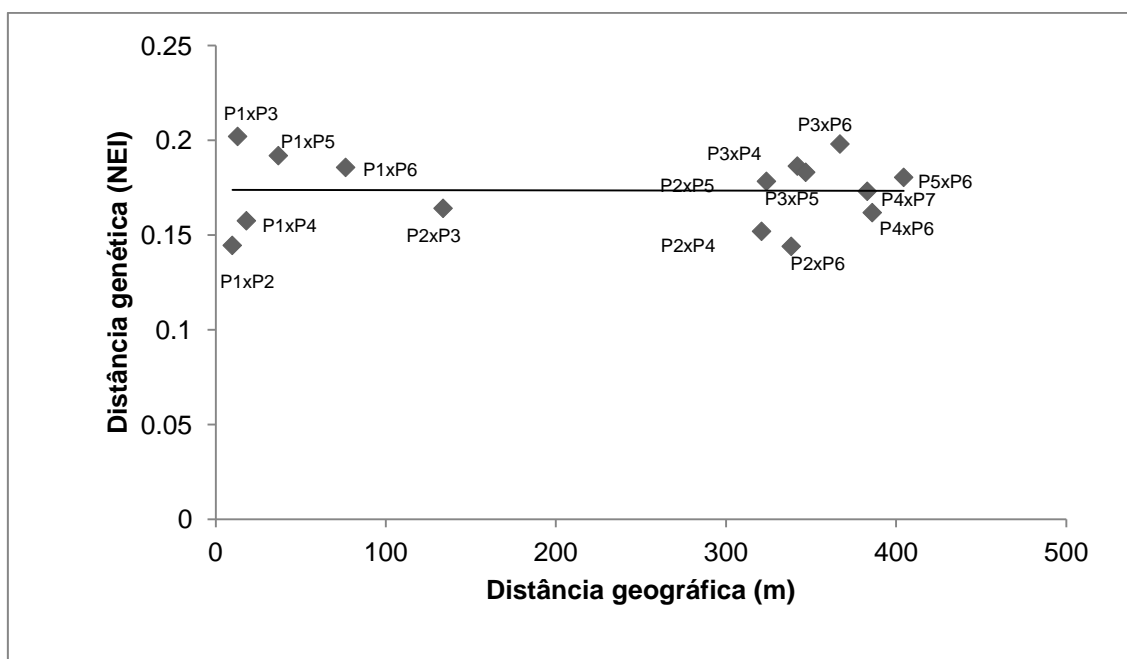


Legenda: (*)- Indivíduos do ponto um; (*) Indivíduos do ponto dois; (*) Indivíduos do ponto três; (*) Indivíduos do ponto quatro; (*) Indivíduos do ponto cinco; (*) Indivíduos do ponto seis;

Fonte: Autoria própria.

Ainda na análise do dendograma, observa-se que os indivíduos apresentam distribuição variada entre eles, não ocorrendo agrupamentos definidos de indivíduos por pontos, mesmo padrão foi encontrado no trabalho de Martins-Corder et al., (2009) onde os resultados indicaram que não houve uma relação direta entre distância geográfica e genética. Fato este que se reforça com o teste de Mantel (Figura 13), onde correlaciona as distâncias entre os pontos e a distância genética de Nei (Tabela 4). A análise do gráfico de correlação de distâncias afirma o pressuposto onde se gera uma linha de tendência constante entre os pontos. A distância geográfica não teve caráter de diferenciação genética nesses indivíduos, pois mesmo indivíduos de pontos distantes apresentam similaridade de indivíduos de pontos mais próximos.

Figura 13- Correlação entre distância geográfica (m) e distância genética entre os seis pontos amostrados de *Euterpe edulis*.



Teste t: n.s; Mantel: n.s; Coeficiente de Correlação: -0.0094.
 Fonte: Autoria própria

A baixa diferenciação entre os pontos até os mais distantes geograficamente, pode indicar que está ocorrendo uma dispersão efetiva das sementes do palmitreiro. Podendo inferir que pode estar ocorrendo um fluxo gênico entre esses indivíduos o que provavelmente pode estar relacionado com fatores ecológicos de dispersão, como em trabalho realizado por Moraes (2016)

no Parque Estadual Lago Azul, onde propôs observar dispersores de *E. edulis*, verificou a presença de algumas espécies de mamíferos que tem interação com os frutos de *E. edulis* como paca, cutia, veados e cachorro do mato. Foi observada também a presença de aves do gênero *Leptotila* e *Penelope* e também espécies da família Ramphastidae e Turdidae. Esses animais apresentam um grande potencial de dispersão para *E. edulis*.

Dorneles et al., (2010) objetivou em seu trabalho identificar os principais polinizadores de *E. edulis* em Santa Catarina e nele verificou a presença de abelhas e moscas sendo consideradas como polinizadoras potenciais para essa palmeira, deste modo uma efetiva polinização pode estar ocorrendo na área de estudo, onde abelhas e outros insetos podem estar causando fluxo gênico nesses indivíduos.

Tabela 4- Relação dos pontos, Distâncias geográficas e genéticas dos pontos amostrais de coleta.

Pontos amostrais	Distância geográfica (m)	Distância genética (Nei)
P1XP2	76,48	0.18
P1XP3	113,79	0.16
P1XP4	383,13	0.17
P1XP5	404,54	0.18
P1XP6	386,05	0.16
P2XP3	36,94	0.19
P2XP4	342,03	0.18
P2XP5	357,09	0.19
P2XP6	338,43	0.14
P3XP4	323,86	0.17
P3XP5	346,95	0.18
P3XP6	321,00	0.15
P4XP5	13,00	0.20
P4XP6	18,16	0.15
P5XP6	9,85	0.14

Fonte: Autoria própria

Outra possibilidade que pode explicar a baixa diferenciação entre os pontos amostrais é a questão do plantio desses indivíduos. O gerente do

PELA, Sr. Rubens, informou que houve plantio de indivíduos de *E. edulis* no parque que podem ser oriundos de uma mesma matriz, podendo ser de uma mesma população, gerando assim baixa diversidade genética entre os indivíduos estudados. O manejo incorreto de espécies pode resultar na erosão genética artificial, causando a perda de genes importantes para a natureza como um todo (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

O polimorfismo de um determinado grupo é causado pela existência de variantes genéticas, representadas pelo número de alelos por *locus* e por sua frequência de distribuição nos indivíduos no grupo (GRAVITOL et al., 2010) deste modo há necessidade de introdução de materiais genéticos de outras áreas de ocorrência do palmitreiro para ampliar a base genética desses indivíduos de modo que impeça, futuramente, a erosão genética deles no PELA, já que apresentam grande importância ecológica para o local, fornecendo alimento para uma diversa fauna existente na área do parque.

O conhecimento e a organização da variabilidade genética é um passo importante para a conservação genética e para futuros trabalhos de melhoramento, uma vez que o desmatamento, extrativismo e a fragmentação florestal, ocasionado pela expansão agrícola, têm gerado perdas irreparáveis no que concerne aos fatores ecológicos e genéticos da manutenção da biodiversidade das espécies (ASNER et al., 2009; BROADBENT, 2008; LAURANCE; PERES, 2006). A perda de alelos leva à redução, na capacidade das espécies, de responder a adversidades ambientais em gerações futuras (YOUNG et al., 1996). A perda de variabilidade genética, significa a perda de material genético (genes ou alelos) ao longo do tempo por diversos fatores, de âmbito natural ou artificial, entre as causas da erosão genética estão a perda do habitat natural, distúrbios no habitat, desastres naturais, substituição de variedades locais ou tradicionais e mudanças nas práticas culturais, etc. (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2009). Deste modo, conhecer a diversidade genética de uma espécie é crucial para manter a capacidade natural de responder as mudanças climáticas e a todos os tipos de estresses bióticos e abióticos (MACHADO et al., 2008)

Apesar da baixa informatividade dos *primers* para *E. edulis*, o resultado deste trabalho é de grande importância, pois é um dos primeiros na região a utilizar a ferramenta da biologia molecular a fim de averiguar a diversidade

genética de *E. edulis*, bem como ser um dos primeiros a utilizar marcadores ISSR para esta espécie já que poucos trabalhos deste caráter foram encontrados na literatura.

O estudo da diversidade genética de *E. edulis* é importante devido a decorrência do crescente extrativismo desta espécie. Além disso, informações sobre a diversidade genética são importantes não apenas para estudo da flora, mas também para elaboração de estratégias de conservação e uso racional de recursos genéticos.

6 CONCLUSÃO

Os *primers* utilizados para *E. edulis* apresentaram baixo índice de PIC, H e apenas 33,41% de bandas polimórficas, demonstrando ser pouco informativo para a espécie. Dos iniciadores utilizados o ISSR14 foi o que mais se mostrou eficaz obtendo 100% de anelamento dos indivíduos amostrados e o maior valor de polimorfismo (58,04%). Porém, esses valores ainda são considerados pouco informativos.

As análises de diversidade genética mostraram que os pontos amostrais apresentaram baixo índice de heterozigosidade, podendo ser consequência de endogamia. A área de coleta deste estudo apresentava manchas de indivíduos de *E. edulis*, porém só foram coletadas para pesquisa as plântulas de alguns indivíduos adultos. Os demais que se encontravam no local não foram amostrados devido à dificuldade de coleta do material vegetal. Apesar de não ser possível identificar a relação genética de indivíduos adultos com as plântulas, esse trabalho pode averiguar o grau de semelhança genética entre as plântulas podendo aferir que essas apresentam alto grau de endogamia.

As análises de variância molecular juntamente com o dendograma de similaridade genética dos indivíduos demonstraram que há maior diversidade genética dentro dos pontos amostrais e menor diversidade genética entre os pontos amostrais. Esse panorama pode ser explicado devido ao fato dos indivíduos amostrados neste trabalho serem parte de uma só população. No PELA há presença de dispersores de *E. edulis* e eles podem estar sendo

efetivos na dispersão da semente do palmitero porém os indivíduos de *E. edulis* não apresentaram alta variância genética, podendo causar um problema futuro na geração dessa população devido ao baixo índice de heterozigosidade e perda do vigor híbrido.

Deste modo, propõe-se a implementação de um programa de conservação e manejo sustentável da espécie, dando maior atenção na escolha dos indivíduos a serem introduzidos na área do PELA podendo adicionar indivíduos de outros viveiros e até mesmo outros locais geográficos a fim de introduzir novos genes na população. De modo a evitar que ocorra a erosão genética desses indivíduos e aja uma perpetuação desta espécie que se demonstra com um papel ecológico tão importante.

Com este trabalho, pode-se verificar a importância do estudo genético das espécies mesmo em áreas próximas uma das outras. Onde, teoricamente essas estariam se perpetuando, porém quando olhado em âmbito genético, nota-se que existe um déficit na troca genética entre esses indivíduos. Tendo assim que modificar o manejo desta espécie.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, F.F.A; SCHAEFER, S.M; LOPES, E.A; TOLEDO, C.B. **Produção de mudas de palmito juçara (*Euterpe edulis* Mart.)**. Governo do Estado de São Paulo, Secretaria de Estado do Meio Ambiente. São Paulo: Instituto de Botânica, 16p, 2002.
- ALMEIDA, C.M.A; LIMA, S.E.N; LIMA, G.S.A; BRITO, J.Z; DONATO, V.M.T.S; SILVA, M.V. Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. **Ciênc. Agrotec.** [online] 2009, vol.33, n.spe, PP.1771.1776. ISSN 1413-7054, 2009.
- ARBI, G.; NACEUR, B.; CHOKRI, M.; MOHAMED, B.; MOHAMED, N. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from *Allium roseum* L. (*Alliaceae*). **African Journal of Biotechnology** 8(17): 4020-4024, 2009.
- ASNER, G. P.; RUDEL, T. K.; AIDE, T. M.; DEFRIES, R.; EMERSON, R. A contemporary assessment of change in humid tropical forests. **Conservation Biology**. v.23, n. 6, p. 1386-1395, 2009.
- BERED, F; NETO, J.F.B; CARVALHO, F.I.F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, v.27, n.3, p.513-520, Santa Maria, 1997.
- BOLSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- BOVI, M.L.A.; GODOY Jr, G.; SAES, L.A.. Correlações fenotípicas entre caracteres da palmeira *Euterpe edulis* Mart. e produção de palmito. **Revista Brasileira de Genética**, v. 14, p. 105-121, 1991.
- BRANDÃO, M. M. **Diversidade genética de *Myrcia splendens* (SW.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistema corredor-fragmento semidecíduais no sul de Minas Gerais**. 2008. 80 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa n. 6, de 23 de setembro de 2008. Espécies da flora brasileira ameaçada de extinção **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2008. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/179/_arquivos/179_05122008033615.pdf. Acesso em: 25 abr. 2016
- BROADBENT, E.; ASNER, G. P.; KELLER, M.; KNAP, D.; OLIVEIRA, P.; SILVA, J. Forest fragmentation and edge effects from deforestation and selective logging in the Brazilian Amazon. **Biological Conservation**. v. 140, n. 7, p. 142–155, 2008

CAMPESTRINI, S. ***Euterpe edulis* Mart.** Flora Digital. NIKON (COOLPIX P100); ISSO 160, SC, 2011. Disponível em <
http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=6041> Acesso em. 30.dez, 2017.

CARVALHO, J.M.F.C; SILVA, M.M.A; MEDEIROS, M.J.L. **Perda e conservação dos recursos genéticos vegetais.** EMBRAPA Algodão. Documentos, 221. ISSN 0103-0205, Campina Grande, 2009.

CASTRO, E.R. **Variação do espaço temporal na fenologia e frugivoria do palmito juçara *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae) em três tipos de floresta atlântica.** 126f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista Departamento de Ciências biológicas, Rio Claro, 2003.

CENTRO NACIONAL DE CONSERVAÇÃO DA FLORA (CNCFLORA). **Livro vermelho da flora do Brasil – *Euterpe edulis* Mart.: Informações da avaliação de risco de extinção.** 2013, disponível em <
<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Euterpe%20edulis>>. Acesso em 20. Out. 2016.

CIDADE, F. W.; SOUZA-CHIES, T. T.; BATISTA, L. A. R; DALL'AGNOL, M. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Paspalum notatum* Flügge (Poaceae). **Conservation Genetics**, Arlington, v. 10, n. 6, p. 1977-1980, 2009.

CONTE, R. **Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites.** Tese de doutorado. 122p. ESALQ/USP, Piracicaba, 2004.

CORRÊA, E. M.; POSSIK P. A. **A análise de DNA por eletroforese.** In:NAOUM, P.C *Eletroforeses: Hemoglobinopatias, Proteínas Séricas, Lipoproteínas e DNA.* Grupo Editorial Nacional (GEN), 2011.

CÔRTEZ, M.C. **Variação espacial nas interações entre o palmito *Euterpe edulis* e as aves frugívoras: implicações para a dispersão de sementes.** Dissertação (Mestrado), 95p. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rio Claro, 2006.

COUTINHO, T.C; GUIMARÃES,M.A; VIDAL, M.S. Determinação da diversidade genética entre acessos de algodão por meio de marcadores de microssatélites. **Bioscience Journal**.v.20, n.5, p.1447-1458, Sept/Oct, Uberlândia, 2014.

CRUZ, C.D. **Programa GENES – Aplicativo computacional em genética e estatística.** Editora UFV, Viçosa, Minas Gerais, 1997.

DORNELES, L. L.; PADILHA, M. T.; MILLER, P. R. M.; GONÇALVES, P. F.; STEINER, J.; ZILLIKENS, A. **Polinização de *Euterpe edulis* (Arecaceae) por abelhas em sistema agroflorestal na ilha de Santa Catarina.** 2010.

Disponível em < <http://www.sct.embrapa.br/cdagro/tema02/02tema08.pdf>>
Acesso em: 01 de dezembro de 2017.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. **Protocolo de extração de DNA de tecido vegetal**, 1987. Disponível em
<https://lgbio.icb.ufg.br/up/275/o/Protocolo_de_extracao_de_DNA_Doyle___Doyle_1987.pdf> Acesso em: 18 de Março de 2017.

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

FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Embrapa Cerrados, Planaltina, 2007.

FERREIRA, M.E. , GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3º ed. Brasília: **Embrapa-Cenargem** pp.220. (Embrapa-Cenargem documento 20), 1998.

FERREIRA, M.F.M. **Análises Genéticas de *Annona crassiflora* (Annonaceae): Implicações para a conservação da espécie**. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

FERRO, D.A.C. **Variabilidade genética e análises estatísticas na conservação dos recursos genéticos de Bovinos locais**. (Seminário). 26f. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

FILHO, C.R. **Alterações na variabilidade genética de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae)**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

FRUEHWIRTH, M; DELAI, R.B; FOLHA, R.A. Técnicas de biologia molecular aplicada a perícia e ciência forense. **Derecho y Cambio Social**, 2015.

FUGANTI, R; BENEVENTI, M.A; SILVA, J.F.V.S; ARIAS, C.A.A; MARIN, S.R.R; BINNECK, E; NEPOMUCENO, A.L. Identificação de marcadores moleculares de microssatélites para seleção de genótipos de soja resistentes a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 28, n. 02, p. 125-130, 2004.

GALETTI, M.; GUEVARA, R.; CÔRTEZ, M. C.; FADINI, R.; VON MATTER, S.; LEITE, A. B.; LABECCA, F.; RIBEIRO, T.; CARVALHO, C. S.; COLLEVATTI, R. G.; PIRES, M. M.; GUIMARÃES JR., P. R.; BRANCALION, P. H.; RIBEIRO, M. C.; JORDANO, P. Functional extinction of birds drives rapid evolutionary changes in seed size. **Science**, v. 340: 1086-1090, 2013.

GIUSTINA, L. D.; LUZ, L. N.; VIEIRA, F. S.; ROSSI, F. S.; SOARES-LOPES, C. R. A.; PEREIRA, T. N. S.; ROSSI, A. A. B. Population structure and genetic diversity in natural populations of *Theobroma speciosum* Willd. Ex Spreng (Malvaceae). **Genetics and Molecular Research**, v.13, n. 2, p. 3510-3519. 2014.

GONÇALVES, A.C. **Estrutura Genética em populações naturais de *Dimorphandra mollis* Benth. (Fabaceae)**. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

GRATIVOL, C.; LIRA-MEDEIROS, C. F.; HEMERLY, A. S.; FERREIRA, P. C. G. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. **Molecular Biology Rep**, v. 10, p. 547-557. 2010.

HAMMER, O; HARPER, D.A.T; RIAN, P.D. **Past: Palaeontological statistics software package for education and data analysis**, 2001.

HARTL, D.L; CLARK, A.G. **Princípios de genética de populações**. 4 ed. Artmed, 659p, 2010.

HATSCHBACH, G.G., ZILLER, S.R. **Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas de Extinção no estado do Paraná**. Secretaria Estadual do Meio ambiente de Curitiba, Biblioteca Nacional do Paraná. Curitiba, 1995.

HOFFMAN, L.V.; BARROSO, P.A.V. **Marcadores moleculares como ferramentas para estudos de genética de plantas**. EMBRAPA Algodão. Documentos, 147, 35p. Campina Grande-PB, 2006.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ, IAP. **Plano de Manejo – Parque Estadual Lago Azul**. Diretoria de Biodiversidade e Áreas Protegidas. 270 p. Curitiba. 2005.

KAGEYAMA, P. Y; GANDARA, F. B.; SOUZA, L. M. I. Conseqüências Genéticas da Fragmentação sobre Populações de Espécies Arbóreas. **Série técnica IPEF**, Piracicaba, v. 12, p. 65-70, 1998.

LAURANCE, W. F.; PERES, C. A. (Eds.). **Emerging Threats to Tropical Forests**. Chicago: University of Chicago Press, 520 p., 2006.

LIMA, M. **Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular**. Embrapa Algodão. Campina Grande, 2008.

LORENZI, H; SOUZA, H.M; CERQUEIRA, L.S.C; COSTA, J.T.M; FERREIRA, E. **Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas**. Nova odessa, Sp: Instituto plantarum, 2004.

LORENZONI, R.M; SOARES, T.C.B; SANTIAGO, V.F; SILVA, J.A; COELHO, R.I. Utilização de marcadores ISSR na avaliação da divergência genética entre

acessos de biribazeiro. **Rev. Bras. Frutic.** Vol. 36. No. Spe1, Jaboticabal, 2014.

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

MACHADO, A.T.; NASS, L.L.; PACHECO, C.A.P. Cruzamentos intervarietais de milho avaliados em esquema dialélico parcial. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.7, n.3, p 291-394, 2008

MAFEI, R.A. **Considerações para o manejo sustentável do palmito (*Euterpe edulis* Martius)**. Monografia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, P. **Fenologia da floração, frutificação, mudança foliar e aspectos da biologia floral do palmito**. In: REIS, M.S.; REIS, A., *Euterpe edulis* Martius – *Palmito: biologia, conservação e manejo*.p.23-38 Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2000.

MARTINS-CORDER, M. P.; FIALHO, L. E. B.; ZAMBIAZI, D. C.; KONZEN, E. R. Análise da diversidade genética de populações de palmito (*Euterpe edulis* MARTIUS) através de marcadores isoenzimáticos. **Revista Ceres**, v.56, n.2, p.204- 213, 2009.

MARTO, G.B.T; ***Euterpe edulis* (Palmito-juçara)**, 2007. Disponível em: <http://www.ipef.br/identificacao/euterpe.edulis.asp>. Acesso em: 24 abr.2016.

MELO, A. T. O. **Fluxo gênico e estrutura genética espacial de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (*Meliaceae*) em fragmentos florestais de Mata Atlântica**. Dissertação. (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. SECRETARIA DE BIODIVERSIDADE E FLORESTAS. **Áreas prioritárias para a Conservação, Uso Sustentável e Repartição de Benefícios da Biodiversidade Brasileira. Atualização- Portaria MMA nº09, de 23 de janeiro de 2007**. Brasília, DF, Brasil, 2007.

MIRANDA, D. **Eletroforese**. João Pessoa, 13 slides, 2011. Disponível em :: <<https://pt.slideshare.net/DyegoMiranda/aula-10-eletroforese>> . Acesso em 20 de maio, 2017.

MOLINARI, H.G; CROCHEMORE, M.L. Extração de DNA genômico de *Passiflora* spp. Para análises PCR-RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Vol.23, no2. Jaboticabal, 2001.

MORAIS, F.J. **Dispersores de *Euterpe edulis* Mart. em uma área ecotonal entre Florestal Estacional Semidecidual e Floresta Ombrófila Mista no centro-oeste paranaense**. 37p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental) – Coordenação de Engenharia

Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão-PR, 2016.

MORK, J. **BI 315 lab, course: methods in population genetics**. Trondhjem: Department of Botany,, Trondhjem Biological Station,2000. Disponível em < <http://folk.ntnu.no/vmbijmor/jmork/courses/315H02/00Komp.doc>.> Acesso em: 11 Nov. 2017

MORTORA, M. O.; VALERIANO, D. M. Modelagem da distribuição potencial do palmitheiro (*Euterpe edulis* Martius) a partir da variáveis topográficas. **Anais X SBSR**, 21-26 abril, INPE, p. 459-471, Sessão Técnica Oral. Foz do Iguaçu, 2001.

NEB, New England Biolabs. **Master Mixes**. Disponível em < <https://www.neb.com/products/pcr-qpcr-and-amplification-technologies/master-mixes/master-mixes>> Acesso em 15 maio, 2017.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.70, n.12, p.3321-3323, Washington, 1973.

OLIVEIRA, F.L; MOULIN, M.M; BIANCHI, P.A; PIMENTA, S; RODRIGUES, R. Uso de marcadores ISSR para estima a diversidade genética entre acessos de pimenta coletados no Sul do estado do Espírito Santo. **Perspectivas online: biologia & saúde**, 10 (3), PP. 35-43, Campo dos Goytacazes, 2013.

PRECZENHAK, A.P. **Diversidade genética estimada por meio de marcadores moleculares e morfoagronômicos em acessos de mini-tomate**. Dissertação. (Mestrado em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Centro Oeste do Paraná, Unicentro, Guarapuava, 2013.

POVH, J.A.; LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P. et al. Monitoreo genético de programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. **Cienc. Invest. Agrar.**,v.35, p.25-35, 2008.

PRIMACK, R. B; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: Planta, 327 p., 2001.

REDDY, M.P; SARLA, N; SIDDIQ, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v.128, n.1, p.9-17, 2002.

REIS, A. **Dispersão de sementes de *Euterpe edulis* Martius – (Palmae) em uma floresta Ombrófila Densa Montana da encosta atlântica em Blumenau, SC**. 1995. 154 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

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

REIS, A.; ZAMBONIN, R.M.; NAKAZONO, E.M.. Recuperação de Áreas Florestais Degradadas utilizando a Sucessão e as Interações Planta-Animal. **In: Série Cadernos da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica**, Caderno nº 14, São Paulo, 1999.

REIS, C.A.F.; SOUZA, A.M.; MENDONÇA, E.G.; GONÇALVES, F.R.; MELO, R.M.G.; CARVALHO, D. Diversidade e estrutura genética espacial de *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae) em uma floresta paludosa. **Revista Árvore**, v.33, n.2, p.265-75, 2009.

REZENDE, R.K.S; PAIVA, L.V; PAIVA,R; J.C.A; TORGA, P.P; MASETTO, T.E. Divergência genética entre cultivares de gérbera utilizando marcadores RAPD. **Ciência Rural**, v.39, n.8, p.61-72, 2009.

RIVAS, L. H.; GIUSTINA, L. D.; LUZ, L. N. KARSBURG, I. V.; PEREIRA, T. N. S.; ROSSI, A. A. B. Genetic diversity in natural populations of *Theobroma subincanum* Mart. in the Brazilian Amazon. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4998-5006, 2013.

RODERJAN, C.V., GALVÃO, F., KUNIYOSHI, Y.S., HATSCHBACK. As unidades fitogeográficas do estado do Paraná. **Ciência e Ambiente** Ed.24, 75-92, 2002.

ROSSI, A. A. B.; OLIVEIRA, L. O.; VENTURINI, B. A.; SILVA, R. S. Genetic diversity and geographic differentiation of disjunct Atlantic and Amazonian populations of *Psychotria ipecacuanha* (Rubiaceae). **Genética (The Hague)**. v. 136, n. 1, p. 57-67, 2009

ROSSI, F.S; ROSSI, A.A.B; DARDENGO, J.F.E; BRAUWERS, L.Q; SILVA, M.L; SEBBENN, A.M. Diversidade genética em populações naturais de *Mauritia flexuosa* L.f. (Arecaceae) com uso de marcadores ISSR. **Scientia Forestalis**. V.42, n.104, p.631-639, dez, 2014.

SANTOS, A.F.; JÚNIOR, C.C.; NEVES, E.J.M; **Palmeiras para produção de Palmito: Juçara, Pupunheira e Palmeira Real**. Embrapa Florestas. Paraná, 2008.

SANTOS, R.C; QUEIROZ, C.M; BATISTA, V.G.L; SILVA, C.R.C; PINHEIRO, M.P.N; FILHO, A.L.A.G; FILHO, P.A.M; LIMA, L.M. Variabilidade de progênies F2 de amendoim geradas por meio de seleção de genitores ISSR- divergentes. **Ciência Agrônômica**. Vol.44, n3. Fortaleza, 2013.

SIMON, A.A; BORCHARDT, I.; BENEZEZ, M.C; **Perspectivas e potencialidades de produção e de mercado dos produtos da sociobiodiversidade de Santa Catarina**. Governo do Estado de Santa Catarina, 30p. Santa Catarina, 2012.

SOUZA, G.A; CARVALHO, M.R.O; MARTINS, E.R; GUEDES, R.N.C.G; OLIVEIRA, L.O. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pes. Agropec.bras**, Brasília, v.43, n.7, p.843-849, jul, 2008.

VIDOR, M.A; RUIZ, C.P; MORENO, S.V; FLOSS, P.A. Marcadores moleculares em estudos de caracterização de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): O Sabor. **Ciência Rural**, v.32, n.3m p.415-420, Santa Maria, 2002.

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

YOUNG, A.; BOYLE, T. **Forest Fragmentation.** In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. (Eds.). Forest conservation genetics: principles and practice. Collingwood: CSIRO Publishing, 352p, 2000.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistic with special regard to systems of mating. **Evolution.** V.19, p.395-420, 1965.

APÊNDICE A – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO PARA *EUTERPE EDULIS*

Para extração do DNA foi retirado aproximadamente 1 cm de material vegetal, o qual foi macerado em cadinhos de porcelana com 250µl de tampão de resuspensão e transferido para tubo emperdoff 1,5ml com 15 µl de SDS 20% e 15 µl de RNase A (20mg/ml). O produto foi incubado a 55°C durante 15 minutos no thermo-shaker para realizar a lise da amostra. Posteriormente, o material lisado foi centrifugado a 14.000 rpm durante 5 minutos para remoção de substâncias insolúveis. O sobrenadante foi transferido para tubo de microcentrifuga estéril juntamente com 100 µl de tampão de precipitação (N2) e incubado por 5 minutos a -20°C, novamente a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 14.000 rpm e transferido para novo tubo estéril com 375 µl de tampão de ligação (B4) com etanol.

O procedimento de purificação do DNA consistiu na transferência da amostra para o tubo spin de coleta fornecido pelo kit PureLink® e centrifugação do mesmo em microcentrifuga à 15.000 rpm por 30 segundos, descartando o fluxo da amostra. Lavou-se o cartucho do tubo spin com 500 µl de tampão de lavagem (W4) e submetido novamente à centrifugação durante 30 segundos, o descarte do fluxo foi realizado novamente e o cartucho relavado com 500 µl de tampão de lavagem (W5) com etanol, sendo centrifugado novamente por 30 segundos, repetiu-se a lavagem dos cartuchos com os tampões W4 e W5. Para retirada de qualquer tampão residual a amostra foi centrifugada em velocidade máxima durante 2 minutos. Descartou-se o tubo de coleta e colocou-se o cartucho em novo tubo estéril e eluido com 100 µl de tampão de eluição (E1) submetendo a amostra em centrifugação máxima por 1 minuto. O cartucho foi descartado novamente, mantendo no tubo de coleta o DNA purificado. As amostras já purificadas foram armazenadas a -20°C para posteriores aplicações