**INFERÊNCIAS SOBRE HERANÇA QUANTITATIVA E
ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE
Euterpe edulis MART. UTILIZANDO MARCADORES
MICROSATÉLITES**

FERNANDA AMATO GAIOTTO

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. **DARIO GRATTAPAGLIA**

Co-orientador: Prof. Dr. **ROLAND VENCovsky**

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura
“Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de
Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Fevereiro – 2001

ERRATA

Gaiotto, F.A. Inferências sobre herança quantitativa e estrutura genética em populações naturais de *Euterpe edulis* Mart. utilizando marcadores microssatélites. 2001

<i>p.</i>	<i>item</i>	<i>linha</i>	<i>onde se lê</i>	<i>leia-se</i>
1	1	décima sétima e décima oitava	...é uma prática ilegal, pois causa a morte da planta. Mas é feita...	...é uma prática predominantemente ilegal e causa a morte da planta. Porém, é feita...
5	3.1	sexta	Floresta Umbrófila Densa	Floresta Ombrófila Densa
5	3.1	vigésima segunda	Reis, 1997	Excluir citação
9	3.3	quinta e sexta	Fantini et al. (1997)	Reis et al. (1999)
17	3.6	quinta	Caracteres quantitativos...	A expressão dos caracteres quantitativos...
22	3.7	décima primeira	...apresentar significância estatística que não corresponde à verdade biológica	...apresentar significância estatística não detectável através de outros tipos de marcadores.
26	4.1	décima oitava	Floresta Umbrófila Densa	Floresta Ombrófila Densa
27	4.1	terceira	(Ritland, 1996a)	Excluir citação
44	5.1	vigésima terceira	Por isso é considerada uma espécie-chave (Terborgh, 1986).	Excluir frase inteira
62	5.4	vigésima sexta	...escassez de alimento (Terborgh, 1986)	...escassez de alimento.
72	6.1	vigésima sétima	(Reis et al., 1999)	(Fantini et al., 1997)
73	6.2.3	quarta	Os transectos possuíam respectivamente 227,4 m e 166m.	Os transectos possuíam respectivamente 227,4 m e 166m de comprimento por 4m de largura.
75	6.2.3.1	décima sétima	Fantini et al., 1997)	Excluir citação
100	6.3.2	décima sétima	...variância genética existente dentro de famílias...	...variância genética existente entre famílias...

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Gaiotto, Fernanda Amato

Inferência sobre herança quantitativa e estrutura genética em populações naturais de *Euterpe edulis* Mart. utilizando marcadores microsatélites / Fernanda Amato Gaiotto. - - Piracicaba, 2001.
122 p.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.
Bibliografia.

1. Genética de população 2. Genética quantitativa 3. Hereditariedade 4. Marcador genético 5. Palmeira 6. Palmito 7. Parâmetro genético I. Título

CDD 634.61

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Ao Marcelo Bramucci,
com todo o meu amor,
DEDICO

Ao nosso filhinho que
vai chegar, OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial:

Ao Dr. Dario Grattapaglia, pela orientação, amizade, incentivo, apoio e exemplos de garra e força de vontade, desde os tempos do mestrado;

Ao Prof. Dr. Roland Vencovsky pela orientação, atenção e ensinamentos não apenas de genética, mas também de humildade e de vida;

Ao colega Alexandre Siqueira Guedes Coelho, pelas discussões valiosíssimas, ensinamentos (de orientador mesmo!!) e auxílios inestimáveis nas análises de parentescos e herança quantitativa;

Aos colegas Alexandre Magno Sebbenn e Eduardo Leonardcz pela ajuda nas análises de genética quantitativa;

Ao pessoal que colaborou imensamente durante o trabalho de campo lá em Brasília (Kleyne, Camila, Alexandre, Sue Anne, Joãozinho, Camarão, Bruno Walter, Aldicir Scariot e principalmente Marcelinho e Scott);

À Antonieta Salomão e Sr. Domingos pelas sugestões na montagem do experimento na casa de vegetação;

À colega Rosana Brondani pelos ensinamentos e ajuda durante o desenvolvimento dos microssatélites para palmitreiro;

À Dra. Célia Cordeiro pela prontidão em auxiliar e pelas discussões sobre parentesco;

Ao colega Anders Gonçalves da Silva pela grande ajuda durante a fase de transferibilidade de locos SSR para *E. oleracea* e pelos papers enviados pelo correio;

Às amigas Alessandra dos S. Penha e Fernanda V. Macarenko pela força na revisão gramatical;

À grande amiga Ana Y. Ciampi que sempre me ajudou em tudo lá em Brasília, não só pelo incentivo constante ao trabalho, mas principalmente pelo acolhimento em sua própria casa e pelo “carinho de mãe”;

A todos os colegas do laboratório de genética de plantas do Cenargen/Embrapa (Márcio Elias, Dario, Ana, Gláucia, Márcio Moretzson, Marcão, Neide, Luciana, Maria, Rô e Cláudio Brondani, Rosane, Maristerra, Alessandra, Veri, Gorducho, Patrícia, Lucas, Fabiane, Luján, Matias e Mariana Kirst, Anders, Kleyne, Camila, Mariana, Túlio, Nei, Alexandre, Rodrigo e Beló/Vizinho; Epa! Será que eu esqueci alguém?) pelos ensinamentos, discussões, colaboração, risadas... enfim pelo bom convívio;

Aos professores do departamento de Genética da ESALQ/USP que foram os principais responsáveis por minha formação acadêmica durante o doutoramento;

Aos funcionários do departamento de Genética da ESALQ/USP (Leia, “Silvanas”, Betinha, Macedônio, Adriana, Maídia, Berdán, Fernandinho e todos os outros) pelo auxílio sempre com sorriso no rosto;

Ao CNPq pelo apoio financeiro;

Aos colegas da pós pelos estudos em grupo, pela ajuda mútua, pelas demonstrações de amizade e pelo crescimento conjunto (Maria Aldete, Maria Imaculada, Sandra, Ângela, Mauro, Rogério e Lu, Leo, Solange, Cláudio, Gilberto, Andréa e Fabio, Alexandres: Coelho, Missiaggia e Sebbenn, Lu Carlini-Garcia, Lúcia Helena, Monalisa, Lucianinha, Helena, Heider, Eduardo, Aurélio, André e Américo);

Aos novos amigos de Pira: Viviane, Flaviana, Eraldo, Ludmila e Roco; e aos amigos da “quarta-confraria” (Sampa) pelas horas agradáveis que passamos juntos e pelas boas risadas;

Aos amigos do coração: Bodo, Dô, Skru, Mê, Férnand’s, Drica, Mô e Ricardinho, Tin-tin, Lu e Futum, Meméia e Dali que contribuíram com este trabalho através de pensamentos positivos, de palavras carinhosas e da força transmitida;

Aos meus pais (Valter e Pepita), irmãos (Guto e Fabi) e avós (Alberto e Carmen) por estarem sempre presentes na minha vida dando o apoio e o conforto que só a família da gente tem o dom de dar em todos os momentos;

Ao meu Marcelinho que, pra variar, me ajudou demais durante todo o trabalho, durante as coletas, medidas dos caracteres na casa de vegetação, laboratório e layout da tese, além de estar comigo nos melhores anos da minha vida, me dando colo e me confortando nas horas que eu mais precisei;

A Deus, por ter me enviado uma força divina durante toda a execução deste trabalho e por ter me dado a bênção de chegar até aqui e estar agora finalizando mais esta etapa tão importante da minha vida.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBEJETIVOS GERAIS.....	4
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1. CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE.....	5
3.2. DOMESTICAÇÃO E BIOLOGIA REPRODUTIVA DE <i>Euterpe edulis</i>	6
3.3. EXPLORAÇÃO E MANEJO SUSTENTÁVEL DO PALMITO.....	7
3.4. CONSERVAÇÃO DE POPULAÇÕES NATURAIS DE ESPÉCIES ARBÓREAS TROPICAIS.....	10
3.5. PARENTESCO.....	12
3.6. HERANÇA QUANTITATIVA EM POPULAÇÕES NATURAIS.....	16
3.7. MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	19
4. DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA <i>Euterpe edulis</i> MART. E <i>Euterpe oleracea</i> MART.....	23
RESUMO.....	24
4.1. INTRODUÇÃO.....	25
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.2.1. Desenvolvimento de Marcadores Microsatélites.....	27
4.2.2. Condições de Amplificação.....	29
4.2.3. Material Vegetal e Análise de Dados.....	30
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5. ESTRUTURA GENÉTICA, SISTEMA REPRODUTIVO E FLUXO GÊNICO DE LONGA DISTÂNCIA EM PALMITEIRO (<i>Euterpe edulis</i> MART. – ARECACEAE).....	41
RESUMO.....	42
5.1. INTRODUÇÃO.....	44
5.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
5.2.1. Material Vegetal.....	46
5.2.2. Amplificação dos Locos SSR.....	49
5.2.3. Análise Estatística.....	50
5.3. RESULTADOS.....	52
5.3.1 Variação Genética.....	52
5.3.2. Sistema de Reprodução.....	53
5.3.3. Estrutura Genética (Estatísticas F e R_{ST}) e Fluxo Gênico.....	55
5.3.4. Análise de Paternidade.....	56
5.4. DISCUSSÃO.....	58
6. ESTIMATIVAS DE PARENTESCO E DE PARÂMETROS DE HERANÇA QUANTITATIVA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>Euterpe edulis</i> MART. UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	64
RESUMO.....	65
6.1. INTRODUÇÃO.....	66
6.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	73

6.2.1. Material Vegetal.....	73
6.2.2. Condições de amplificação dos locos SSR.....	74
6.2.3. Delineamento Experimental.....	75
6.2.3.1. Experimento em campo utilizando plântulas de <i>E. edulis</i>	75
6.2.3.2. Experimento em condições controladas com plântulas de <i>E. edulis</i>	75
6.2.4. Estimação dos coeficientes de parentesco via marcadores microssatélites.....	78
6.2.5. Estimativa de parâmetros de herança quantitativa baseada em marcadores SSR.....	80
6.2.6. Estimativa de parâmetros de herança quantitativa em condições controladas.....	84
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
6.3.1. Parentesco.....	85
6.3.2. Herdabilidades.....	95
6.3.3. Correlações Genéticas.....	109
7. CONCLUSÕES GERAIS.....	112
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114

**INFERÊNCIAS SOBRE HERANÇA QUANTITATIVA E ESTRUTURA
GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Euterpe edulis* MART.
UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Autora: Fernanda Amato Gaiotto

Orientador: Prof. Dr. Dario Grattapaglia

Co-orientador: Prof. Dr. Roland Vencovsky

RESUMO

A palmeira produtora do palmito de melhor qualidade das regiões Sul e Sudeste do Brasil, *Euterpe edulis* Mart., vem sendo amplamente explorada nas Florestas Tropicais e matas de galeria ao longo dos anos. A conservação desta espécie pode ser efetuada através do manejo sustentado ou de seu plantio comercial, com a manutenção das populações naturais. Para que as estratégias de conservação *in situ* de qualquer espécie tropical sejam bem elaboradas, é fundamental o conhecimento das características genéticas e demográficas das populações a conservar.

Uma bateria de 18 locos microssatélites (ou SSR) altamente informativos foi desenvolvida para *E. edulis*. Tais marcadores foram combinados seis a seis em ensaios multiplex fluorescentes, de maneira que, com apenas três géis de alta resolução, foi possível a análise dos 18 locos em um seqüenciador automático de DNA.

Para o estudo detalhado da estrutura genética populacional e herança quantitativa em *E. edulis*, foram amostrados indivíduos adultos e regenerantes de até um ano de idade em duas populações de matas de galeria do Cerrado brasileiro na região de Brasília – DF. Também foram coletadas sementes para a obtenção de progênes maternas.

Os locos SSR utilizados neste estudo apresentaram uma média de 10,8 alelos por loco. A diversidade alélica média (H_e) e a heterozigosidade observada (H_o) apresentaram valores elevados, 0,749 e 0,690, respectivamente. De acordo com o modelo de acasalamento misto, foi possível mostrar que as populações estudadas são altamente alogâmicas ($t_m=0,941$). A estrutura genética parece ser o resultado do balanço entre a polinização cruzada e o longo movimento de genes, que reduz a diferenciação genética entre estas populações ($F_{IT} = 0,171$; $F_{IS} = 0,117$; $F_{ST} = 0,061$ e $R_{ST}=0,065$). Os baixos valores de diferenciação genética sugerem um alto nível de fluxo gênico entre as populações ($Nm=3,4$ migrantes por geração). Além da estimativa do parâmetro Nm , o fluxo gênico foi ainda avaliado com base em testes de paternidade. Foram detectados dois indivíduos regenerantes com alta probabilidade de serem filhos de adultos distantes 22 km. A distância de fluxo gênico encontrada neste trabalho não havia sido reportada antes para espécies arbóreas tropicais.

A análise da herança quantitativa em populações naturais utilizando marcadores moleculares somente foi possível a partir das estimativas dos coeficientes de parentesco entre pares de indivíduos. O estudo do parentesco com marcadores microssatélites em ensaio de progênie maternas apresentou, em média, o valor $r=0,123$ dentro de progênie. Esse resultado foi congruente com o esperado para meios-irmãos, indicando a eficiência deste método para inferências sobre herança quantitativa.

Os coeficientes de herdabilidade (h^2) para caracteres de plântulas (altura, diâmetro do coleto, número de folhas e número de folíolos da primeira folha completa) foram estimados nestas populações naturais. Os resultados foram comparados aos obtidos nos ensaios de progênie pelos métodos tradicionais de análise de variância (ANAVA). As estimativas de h^2 através da análise convencional foram, em geral, maiores que as obtidas através dos marcadores genéticos. Essa diferença pode ser explicada baseando-se na pressuposição dos modelos, pois, no caso da ANAVA sob alogamia, admite-se parentesco de meios-irmãos. No entanto, parentescos

superiores a esse podem existir em progênies maternas naturais. Assim, as estimativas de h^2 obtidas pelo método de marcadores moleculares são, provavelmente, as que mais se aproximam dos valores verdadeiros, pois são calculados com base no parentesco real existente entre indivíduos. Este trabalho mostrou o potencial do método de análise de herança quantitativa utilizando marcadores moleculares, fornecendo subsídios para o pré-melhoramento em populações naturais.

**INFERENCES ABOUT QUANTITATIVE INHERITANCE AND GENETIC
STRUCTURE ON NATURAL POPULATIONS IN THE *Euterpe edulis*
MART. WITH MACROSATELLITE MARKERS**

Author: Fernanda Amato Gaiotto

Adviser: Prof. Dr. Dario Grattapaglia

Co-adviser: Prof. Dr. Roland Vencovsky

ABSTRACT

Euterpe edulis Mart. produces the best quality heart of palm ("palmito") in the South and Southeast of Brazil, therefore this species has been heavily harvested for years. The conservation of natural populations of *E. edulis* could be achieved through sustainable management of forests or production of commercial crops.

In order to elaborate and effective *in situ* conservation strategy for any tropical species the knowledge of genetics and demographic traits of their populations is fundamental.

To provide this study with detailed information on genetic of population structure and quantitative inheritance adult and juvenile individuals (of up to one year of age) were sampled from two populations of *E. edulis*. These populations are located 22 km apart in gallery forests within Brazilian *Cerrado* in the surroundings of Brasilia - DF. Additionally, seeds for development of maternal families were also collected.

A battery of 18 microsatellite loci (or SSR) highly informative was developed for *E. edulis*. These markers were combined in multiplex assays and only three high-resolution gels made it possible to analyze the 18 loci in an automatic DNA sequencer.

The SSR loci used in this study had an average of 10.8 alleles per locus. Average gene diversity (H_e) and observed heterozygosity (H_o) presented high values: 0.749 and 0.690 respectively. A multilocus mixed mating model was used to evaluate the mating system of the natural populations of *E. edulis*. Results showed that the studied populations are highly outcrossed ($t_m=0.941$). Genetic structure may be the result of a balance between cross-pollination and long movement of genes that reduce genetic differentiation between these populations ($F_{IT} = 0.171$; $F_{IS} = 0.117$; $F_{ST} = 0.061$ and $R_{ST}=0.065$). These low values of genetic differentiation suggest high levels of gene flow between these populations ($Nm=3.4$ migrants per generation). In addition to estimated Nm , gene flow was also evaluated using paternity test. It was found out that two juvenile individuals presented high probability of being fathered by two adult individuals located 22 km apart. The gene flow detected in this work has never been reported before for any tropical forest species.

Quantitative inheritance analysis using molecular markers was just possible because we have estimated the coefficient of relatedness between pairs of individuals. The inferences of relatedness with microsatellite markers within maternal progenies showed average values of $r=0.123$. This result was congruent with expected values for half-sibs indicating the efficiency of this method for estimation of quantitative inheritance.

Narrow sense heritability (h^2) among juvenile traits (height, diameter, number of leaves and number of leaflets at first complete leaf) were estimated for these natural populations. The results were compared to that obtained by traditional methods of analysis of variance (ANAVA) at progeny assays. In general, the estimates of h^2 by ANAVA were higher than those obtained by genetic markers. This difference can be explained by the models which (for ANAVA) admit half-sibs relatedness under allogamy. However, relatedness higher than half-sibs can occur in natural maternal progenies.

Therefore, estimates of h^2 obtained by marker-inferred relatedness are probably the nearest to the real value of h^2 because they are calculated

on the real relatedness between individuals. This work showed the potential of quantitative inheritance analysis using molecular markers providing subsidies for pre-breeding on natural populations.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Por ser considerada uma espécie-chave, segundo o conceito de Terborgh (1986), uma vez que fornece alimento para várias espécies de animais durante um período de escassez alimentar na Floresta Tropical, o palmitreiro, *Euterpe edulis* Mart., foi escolhido para ser alvo do presente estudo. Outro motivo para escolha dessa espécie foi sua ampla densidade populacional, o que permitiu amostrar um grande número de indivíduos por população em uma área de trabalho relativamente pequena. Além disso, *E. edulis* apresenta elevado valor comercial, sendo a principal produtora de palmito do Sul e Sudeste do Brasil. Assim, o esforço em se desenvolver marcadores microssatélites e aplicá-los em estudos não apenas de conservação, como também de pré-melhoramento, torna-se perfeitamente justificável.

Devido ao elevado valor comercial do palmito e da precariedade e escassez de plantios comerciais, grande percentagem deste produto encontrado no mercado é proveniente de atividades extrativistas, seja de *E. edulis* no Sul e Sudeste do país, seja de *E. oleracea* na região amazônica. A extração do palmito de *E. edulis* é uma prática ilegal, pois causa a morte da planta. Mas é feita de maneira clandestina, servindo de renda complementar para muitas famílias humildes, principalmente na região do Vale do Ribeira, São Paulo (Reis, 1996).

Baseado nessas informações, duas maneiras de explorar a espécie *E. edulis* como produtora de palmito e ao mesmo tempo conservá-la seriam através do manejo sustentável (Anjos et al. 1998; Fantini et al. 1997 e Reis et al. 1999) ou do plantio comercial dessa palmeira. A produção poderia ser incrementada a partir de programas de melhoramento genético.

Um amplo conhecimento das características demográficas, da dinâmica populacional (Matos et al. 1999) e da genética da espécie (Reis et al. 1997) são fundamentais para a conservação pelo manejo sustentável. Das características genéticas importantes para a conservação, destacam-se os conhecimentos de fluxo gênico, do sistema reprodutivo e da diversidade entre e dentro de populações.

Estimativas de parentesco entre pares de indivíduos na Floresta Tropical é de grande valia para a conservação, pois são um refinamento da genética populacional nunca obtido até o momento. De posse dos coeficientes de parentesco entre indivíduos de uma população natural, é possível estabelecer áreas de coleta de maneira mais planejada. Dessa forma, a conservação *ex situ*, por exemplo, pode ser realizada com mais eficiência, uma vez que com a coleta de indivíduos não aparentados, maior variabilidade genética pode ser mantida em coleção.

Outra forma de conservar populações naturais remanescentes de espécies muito exploradas é através da combinação entre o melhoramento genético e a conservação *in situ*. Isto pode ser realizado através da manutenção das populações da forma como se encontram na floresta para depois, se iniciar um plantio comercial promovendo incrementos na produção de seus produtos de interesse a partir do melhoramento genético. Como não existe, até o momento, trabalhos de melhoramento clássico em *E. edulis*, estimar parâmetros importantes para o melhoramento já nas populações naturais, onde a coleta de sementes para uma população base de melhoramento seria efetuada, é uma estratégia para acelerar tal processo.

O conhecimento dos coeficientes de herdabilidade sob condições naturais tem grande importância, já que a resposta genética à seleção (R) ou a mudança da média fenotípica entre gerações é determinada pelo produto do coeficiente de herdabilidade (h^2) com o diferencial de seleção fenotípica (S) (Falconer & Mackay, 1997). Além disso, a obtenção de coeficientes de herdabilidade, em conjunto com a magnitude da variância

genética aditiva existente em populações naturais, principalmente no que se refere a características ecologicamente importantes, seria um grande passo na elaboração de estratégias de manejo e conservação (Coelho, 1997).

O método utilizado neste trabalho para a determinação de parâmetros genéticos em populações naturais foi descrito por Ritland (1996a). Este método estima parâmetros de genética quantitativa em populações naturais sem alterar suas condições de avaliação. Tais parâmetros são obtidos através da covariância entre o coeficiente de parentesco, determinado via marcadores moleculares, e estimativas de similaridade fenotípica para um caráter quantitativo.

O conhecimento destes parâmetros quantitativos será fundamental em programas de pré-melhoramento para espécies nativas da Floresta Tropical, uma vez que poderão ser obtidos *in situ* de maneira rápida e eficiente através do auxílio de marcadores genéticos.

Por serem codominantes, altamente informativos e neutros, não sofrendo influência ambiental, marcadores microssatélites são considerados ideais para a abordagem utilizada neste estudo, ou seja, para a obtenção de coeficientes de parentesco entre indivíduos em condições naturais, a fim de serem utilizados nas estimativas de coeficientes de herdabilidade e covariâncias genotípicas para caracteres quantitativos de interesse nestas populações.

Este trabalho buscou estudar caracteres quantitativos *in situ*, dando um passo além dos estudos tradicionais de genética de populações naturais, que geralmente quantificam a variabilidade genética da população, determinam o sistema preferencial de reprodução e estimam a distância genética entre indivíduos. Estas informações são, sem dúvida, fundamentais para a coleta, conservação e manejo sustentado de espécies nativas. Porém, a estimativa do coeficiente de parentesco entre indivíduos, bem como a obtenção de parâmetros genéticos quantitativos em populações naturais via marcadores moleculares, permitirá o início de programas de pré-melhoramento genético *in situ* para a *E. edulis*.

2. OBEJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como principais objetivos:

1. Desenvolver uma bateria de marcadores moleculares codominantes e multialélicos baseados em microssatélites para *Euterpe edulis*;
2. Determinar o sistema de cruzamento existente nas populações de *E. edulis* estudadas, com base em marcadores microssatélites;
3. Estimar o fluxo gênico entre e dentro das populações com base em testes de paternidade;
4. Estudar a variabilidade e a estrutura genética das populações amostradas de *E. edulis* de matas de galeria do Cerrado brasileiro;
5. Estimar o coeficiente de parentesco entre pares de indivíduos localizados em seus habitats naturais através de marcadores microssatélite.
6. Estimar parâmetros genéticos quantitativos (herdabilidade e correlação genética) para caracteres relacionados com a produção de palmito em duas populações naturais de *E. edulis*.
7. Comparar estimativas de herdabilidade obtidas de plantas em seu habitat natural com as obtidas pelos métodos tradicionais sob condições controladas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Características da Espécie

A espécie *Euterpe edulis* Mart. é pertencente à família Arecaceae e faz parte da composição florística da Floresta Tropical Atlântica Brasileira. Ocorre desde o sul da Bahia (15°S) até o norte do Rio Grande do Sul (30°S). Palmeiras desta espécie são típicas de locais úmidos e sombreados, assim seus exemplares são geralmente encontrados na região de mata ciliar (Floresta Umbrófila Densa). Seu estipe reto atinge cerca de 10 a 20 m de altura e 10 a 20 cm de diâmetro à altura do peito (DAP). As folhas, de 1,0 a 1,5 m de comprimento, são alternas e pinadas, com bainhas de coloração acastanhada e folíolos longos, estreitos e geralmente pendentes. Esta palmeira monóica possui inflorescências em forma de espádice de 50 a 70 cm de comprimento, composta por várias espigas. Os frutos têm forma de drupa esférica, com um epicarpo pouco denso. Depois de maduros, os frutos são de coloração preta. Uma planta chega a produzir de 6 a 8 kg de frutos por ano, equivalente a cerca de 8.000 a 10.000 sementes (Guerra et al., 1984). O florescimento ocorre na primavera e a maturação dos frutos no outono e inverno. A primeira florada acontece quando o indivíduo está com 6 a 7 anos. A dispersão de frutos é realizada por aves (tucanos, araçaris, sabiás, jacus, entre outros) e roedores (ratos, preás, cotias e caxinguelês), enquanto a dispersão de pólen é feita principalmente por insetos. Sua taxa de crescimento é em média 0,80 cm/ano, até nove anos. Depois desta idade, a média de crescimento cai para 0,30 cm/ano (Mattos & Mattos, 1976; Matos & Watkinson, 1998; Reis, 1997).

E. edulis é uma palmeira que pode ser totalmente aproveitada. O palmito ou “creme”, é a parte comestível do broto. Esta espécie é a produtora do palmito de melhor qualidade. O estipe é empregado em construções rurais, para lenha e ainda pode servir de matéria prima para produção de celulose. O papel produzido a partir de celulose de *E. edulis* apresenta grande resistência ao rasgo, porém é de difícil branqueamento. As folhas são usadas em cobertura de casas rústicas e em trabalhos artesanais. Os frutos servem de alimento para suínos e para produção de vinho. As sementes podem ser utilizadas na composição de rações ou empregadas como adubo (Mattos & Mattos, 1976).

3.2. Domesticação e Biologia Reprodutiva de *Euterpe edulis*

Os primeiros estudos para a domesticação de palmitreiro foram realizados pelo Instituto Agrônômico de Campinas (IAC). Cardoso & Leão (1974) apresentaram resultados preliminares, descrevendo técnicas de cultivo, semeadura, conservação de sementes, espaçamento, época de plantio e germinação.

Tanto *E. edulis* (palmitreiro) quanto *E. oleracea* (açazeiro) são produtoras de palmito, entretanto a produtividade e a qualidade do produto de *E. edulis* são superiores as de *E. oleracea*. A vantagem do açazeiro sobre o palmitreiro é que a colheita de palmito não implica na morte da planta, em função do perfilhamento. No caso do *E. edulis*, o palmito é de bom rendimento e ótima qualidade, porém para sua extração é necessário o corte total da planta. Estudos foram realizados por Bovi et al. (1987) para a obtenção de híbridos entre as duas espécies produtoras de palmito. Os autores obtiveram um híbrido interespecífico que apresentou produção e qualidade do produto superiores a ambos os genitores. O híbrido apresentou perfilhamento, que é a principal característica de interesse de *E. oleracea*, e palmito com paladar semelhante ao produzido por *E. edulis*, o mais aceito no mercado. Campos et al. (1991) sugeriram maneiras de cultivo dos

híbridos e ainda correlacionaram características morfológicas juvenis das plântulas com a produção de palmito.

A inflorescência do palmiteiro é uma panícula com grande número de ráquias. Cada ráquia apresenta vários conjuntos de flores monóclinas (tríades), sendo duas flores masculinas e uma feminina. A florada masculina dura cerca de 15 dias. A abertura das flores femininas, em *Euterpe edulis*, ocorre após o término do florescimento masculino, durando cerca de 12 dias. Segundo Reis et al. (1993), em estudo fenológico realizado em um fragmento de mata ciliar no município de Piracicaba / SP, não houve sobreposição entre as floradas masculinas e femininas da mesma inflorescência. Os insetos que visitaram as flores de *E. edulis* pertenciam a 15 espécies. As principais são da ordem Apoidae, em especial *Trigona spinipes*, encontrados, com as curbículas repletas de pólen, visitando flores masculinas e femininas de *E. edulis*.

Foi detectado um ligeiro grau de endogamia nas sete populações de *E. edulis* do Sul e Sudeste do Brasil, estudadas por Reis (1996) e, portanto, um desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. A taxa de cruzamento aparente encontrada para tais populações foi de 0,92. Foi observada ainda uma ampla heterozigosidade para a espécie, através de marcadores isoenzimáticos (0,378 a 0,57), que indicou um alto grau de diversidade para a espécie. A relevância desta ampla diversidade, principalmente dentro de populações, está na formação de novas gerações que apresentarão formas recombinantes e, portanto, maior chance de adaptação a microambientes e manutenção da dinâmica populacional.

3.3. Exploração e manejo sustentável do palmito

O palmito é o principal produto de interesse comercial produzido por *E. edulis*. Sua principal forma de exploração é o extrativismo em áreas onde a espécie apresenta grande abundância, geralmente na Floresta Tropical Atlântica. Esta palmeira leva de 8 a 10 anos para atingir um crescimento

ideal (DAP > 8cm) para a comercialização do palmito (Galetti & Fernandez, 1998).

O palmito em conserva já possuía um mercado interno garantido quando passou a ser exportado para França, Estados Unidos, Bélgica, Alemanha, Argentina, Espanha, Canadá, México, entre outros, a partir da década de 60. Houve, então, um incremento nas exportações deste produto ao longo dos anos, e um aumento do valor do produto no mercado internacional (Guerra et al. 1984; Mattos & Mattos; 1976). Por este motivo, muitas populações de *E. edulis* existentes na Floresta Atlântica foram extintas pela intensa exploração.

Apesar de muitas indústrias de envasamento de palmito terem se mudado para a região amazônica na década de 80 para a extração do palmito de *E. oleracea*, o palmito de *E. edulis* continua sendo explorado, em grande escala, nas regiões Sul e Sudeste, sendo responsável por cerca de 16% da produção de palmito do país (Galetti & Fernandez, 1998).

Geralmente, cada hectare de Floresta Atlântica chega a ter 500 a 650 plantas de *E. edulis* em fase de colheita. Cada planta produz em média 300 a 400g de palmito "creme", portanto, em um hectare é possível colher cerca de 150 a 260 kg de palmito prontos para a comercialização (Orlande et al., 1996). Apesar da alta produção, a demanda pelo produto é ainda superior e as populações continuam a diminuir, pois o palmito pode ser colhido em áreas particulares, em muitos casos, com a autorização do IBAMA, sendo que a sua colheita é proibida apenas em áreas de preservação ambiental. A recomendação de Galetti & Fernandez (1998) é de que a reintrodução de mudas nas matas e o plantio comercial de palmito sejam incentivados e que as indústrias de envasamento que utilizam palmito de áreas de manejo sustentado ou de plantios comerciais possuam um "selo-verde" para que o consumidor possa fazer a devida distinção entre este palmito e o colhido de forma predatória.

Segundo Reis et al. (1997), a base para a sustentabilidade da floresta é a manutenção de seus componentes genéticos e ecológicos. O manejo

florestal deve ser realizado sob uma perspectiva conservacionista, onde a dinâmica populacional, a estrutura genética das populações naturais, bem como suas interações com as outras espécies do ambiente sejam preservadas.

Baseando-se apenas em caracteres fenotípicos de produção, Fantini et al. (1997) sugeriram a manutenção de no mínimo 50 indivíduos reprodutivos por hectare em uma população natural de *E. edulis* do Estado de São Paulo, e que o diâmetro limite de corte (DLC) fosse superior a 10 cm para que o palmito “creme” produzido possuísse um diâmetro mínimo de 2,5 cm. Anjos et al. (1998) confirmaram o sistema de manejo proposto por Fantini et al. (1997) através de uma exploração simulada, verificando que a distribuição de plantas permaneceu praticamente inalterada.

Com base nos resultados obtidos sobre fluxo gênico em populações de *E. edulis*, foi possível estabelecer o tamanho de vizinhança para estas populações. Os grupos parentais que trocam genes ao acaso estão em torno de 67 indivíduos. Ou seja, aproximadamente 60 indivíduos reprodutivos/ha. A redução neste número implicaria numa alteração da estrutura genética e no aumento dos efeitos de deriva genética das populações a médio prazo, levando a possíveis perdas de alelos raros, diminuindo a diversidade genética das populações, trazendo consequências diretas na dinâmica populacional (Reis, 1996).

Os resultados existentes na literatura, no que diz respeito ao manejo sustentável de *E. edulis*, são congruentes para diferentes populações, bem como para diferentes métodos de avaliação. Assim, é possível o estabelecimento imediato de populações sob manejo sustentado, bastando apenas a melhoria na fiscalização e na política ambiental para que isto de fato ocorra.

3.4. Conservação de populações naturais de espécies arbóreas tropicais

Apesar de muitos autores enfatizarem a importância da conservação *in situ* das Florestas Tropicais, esta tem sido realizada com base em dados empíricos ou pouco específicos das comunidades ou ecossistemas a serem conservados (Gandara, 1998).¹

Estratégias de conservação *in situ* devem ser desenvolvidas com base no conhecimento dos padrões de dispersão de pólen e sementes e da capacidade de regeneração de determinada espécie. Existe ainda uma grande importância em relacionar os estudos demográficos aos genéticos, para que a conservação de populações naturais seja realizada de maneira eficiente, a fim de preservar a maior percentagem possível de indivíduos que representem geneticamente a espécie em questão (Ciampi, 1999; Scariot, 1999). Além disso, tais conhecimentos são ainda relevantes para que a exploração de recursos genéticos vegetais tropicais seja realizada de maneira planejada e não predatória (Brown, 1978).

Vários fatores evolucionários, tais como seleção e deriva genética podem trazer importantes conseqüências para a estrutura genética de populações, afetando sua dinâmica. Entretanto, a magnitude dos efeitos de deriva e seleção nos padrões de variação genética é dependente da habilidade reprodutiva dos indivíduos da população e de seu impacto no fluxo gênico. Estudos de sistemas de cruzamento e de dispersão de pólen são maneiras de investigar o fluxo de alelos e os níveis de diversidade genética dentro de populações (Hamrick & Nason, 1996).

Segundo Boshier et al. (1995), o conhecimento da gênese da Floresta Tropical e, em particular, da sua biologia reprodutiva podem auxiliar na obtenção de estratégias de conservação deste ecossistema. Assim, é necessário o conhecimento detalhado de todos os aspectos reprodutivos para um bom entendimento da distribuição da diversidade alélica entre e

dentro de indivíduos, do fluxo gênico e da resultante estruturação das populações em espécies arbóreas tropicais.

Uma maneira de relacionar estudos genéticos aos demográficos e de conservação é através do número efetivo populacional (N_e), que por ser quantificado a partir da variância alélica devida à amostragem, é uma medida de representatividade genética de indivíduos avaliados em determinada área (Vencovsky & Crossa, 1999).

Teorias de genética populacional mostram que mudanças nos índices de diversidade genética são uma função do tamanho efetivo populacional que, por sua vez, é determinado pela taxa de migração entre populações e pela variação no sucesso reprodutivo entre machos e fêmeas (Schnabel *et al.* 1998). A variabilidade genética possui, portanto, um papel fundamental para a evolução da espécie, uma vez que a seleção natural é realizada com base nas diferenças existentes entre indivíduos de uma população, de maneira a permitir, principalmente, o sucesso reprodutivo daqueles mais adaptados ao meio ambiente em que se encontram. Portanto, quanto maior a variabilidade existente na população, maiores suas chances de perpetuação. Desta forma, qualquer estratégia de manejo ou conservação de populações naturais sem informações genéticas a respeito da variabilidade alélica existente entre e dentro destas populações, seria ineficiente (Grattapaglia *et al.*, 1997).

Na última década, ocorreram avanços significativos na área de marcadores genéticos, de maneira que estes passaram a ser bastante utilizados, não apenas na área de melhoramento vegetal, como também em estudos de conservação e biologia reprodutiva de populações naturais. Técnicas como sequenciamento de DNA, minissatélites, microsatélites, AFLP (amplified fragment length polymorphism) e RAPD (random amplified polymorphic DNA), permitiram estudos de parentesco, identificação individual, paternidade, marcadores específicos de determinada população, estudos de genes fundadores, número efetivo populacional, sistema de

¹ GANDARA, F.B. Comunicação pessoal, 1998.

cruzamento, estrutura genética, entre outros, nas populações naturais. Além disso, a amplificação via PCR (polymerase chain reaction) de regiões específicas de DNA mitocondrial, nuclear ou de cloroplasto, permitiu um avanço considerável através de análises mais sofisticadas no campo da genética evolutiva, de eventos de hibridização e da estrutura de metapopulações (Haig, 1998). Enfim, o grande avanço existente atualmente no "conhecimento biológico", utilizado nas estratégias de conservação, é devido, em parte, à ampla utilização de tecnologias genômicas baseadas em DNA para este fim.

3.5. Parentesco

Os gametas de um indivíduo possuem cópias exatas de seus genes, se não ocorreu mutação durante sua formação. Portanto, os descendentes desse indivíduo possuirão cópias de seus genes, denominados "idênticos por descendência". Desta forma, a relação entre indivíduos aparentados é quantificada utilizando-se alelos idênticos por descendência como elo de ligação entre esses indivíduos, ou seja, dois indivíduos só podem ser aparentados se possuírem, em comum, cópias exatas, de pelo menos parte dos seus genes, provenientes de pelo menos um ancestral comum (Souza Jr., 1989).

O primeiro geneticista a estimar o coeficiente de parentesco entre indivíduos foi Wright (1922). O cálculo era realizado através da correlação de frequências alélicas entre os gametas de dois indivíduos. Em 1948, Malécot definiu o parentesco como a probabilidade de um gene tomado ao acaso em um indivíduo X ser idêntico por descendência a um outro gene tomado aleatoriamente em um indivíduo Y. Este coeficiente equivale numericamente à metade do coeficiente de parentesco de Wright (1922) sob sistema reprodutivo aleatório. Um outro método para a estimativa de parentesco foi publicado por Kempthorne (1957), tal coeficiente foi definido pela probabilidade de dois alelos de X serem idênticos por descendência aos

dois alelos de Y e, simultaneamente os dois alelos de X e de Y serem distintos. Além desses, existem outros métodos, publicados posteriormente para a estimação de parentesco entre indivíduos.

Apesar dos diferentes métodos de estimação do parentesco existente entre dois indivíduos, todos eles compartilham duas premissas fundamentais (Lynch & Walsh, 1995):

1. Todos os membros de uma espécie ou população são aparentados entre si pelo simples fato de possuírem cópias de genes que estavam presentes em um remoto ancestral comum em determinada época evolutiva;
2. Genes idênticos por descendência são descendentes diretos de um gene específico carregado por um ancestral individual, num dado loco.

Muitos autores referem-se a estudos de paternidade clássicos como inferências de relações de parentesco entre indivíduos (Chakraborty et al., 1988; Ciampi, 1999; Parker et al., 1998). Na verdade, os estudos de paternidade são um caso particular das estimativas de parentesco. O objetivo dos testes de paternidade é encontrar tantos alelos compartilhados quanto possível entre dois indivíduos, de tal maneira que seja possível atribuir, com elevado poder estatístico, a existência de uma relação de descendência do tipo "progênitor-progênie" entre os indivíduos em análise.

O coeficiente de parentesco entre dois indivíduos é facilmente estimado quando a genealogia entre eles é conhecida. Contudo, quando a genealogia entre os indivíduos é desconhecida, a única maneira de estimar o coeficiente de parentesco é através de marcadores moleculares (Lynch & Ritland, 1999; Ritland, 1989; Ritland, 2000). Uma propriedade indesejável dos estimadores de coeficientes de parentesco através de marcadores genéticos é o amplo erro estatístico a eles associado. É comum os valores de parentesco calculados atingirem valores inferiores a zero ou superiores a um, o que não seria "permitido" para um coeficiente de parentesco (Ritland,

2000). Por outro lado, a grande vantagem dessa abordagem é a possibilidade de estimação de parentesco entre indivíduos dispostos em seus habitats naturais com genealogia completamente desconhecida.

Segundo Lynch & Ritland (1999), o coeficiente de parentesco entre pares de indivíduos, desempenha um papel importante nas várias áreas da genética (quantitativa e conservacionista) e da ecologia comportamental. Em genética quantitativa, por exemplo, a semelhança fenotípica entre parentes, base para a estimação dos componentes de variância genética, é uma função direta da probabilidade de indivíduos possuírem um ou mais genes idênticos por descendência em determinado loco. Na área da genética conservacionista, o conhecimento do parentesco entre plantas de populações naturais tem grande importância para a coleta de material a ser conservado *ex situ*, pois com este tipo de conhecimento, o pesquisador pode percorrer áreas ideais de coleta. Economizando tempo, custos e ainda realizando uma coleta de maneira mais eficiente, ao coletar propágulos apenas de indivíduos com o menor grau possível de parentesco, maximizando a variabilidade genética do material armazenado em bancos de germoplasma.

Para a conservação *in situ*, a grande inovação do conhecimento de parentesco relaciona-se aos casos específicos de testes de paternidade, em que é possível estabelecer de maneira direta o fluxo gênico existente entre e dentro de populações. Com isto, é possível identificar áreas de vizinhança, onde os indivíduos trocam genes com maior intensidade e estabelecer de maneira mais precisa áreas de conservação para as diversas espécies. Desta forma, existe ainda uma fina relação entre o parentesco e a estrutura genética existente dentro de populações de plantas (Hamrick & Nason, 1996). Indivíduos próximos costumam ser mais aparentados que indivíduos distantes, principalmente se estes possuem dispersão de sementes pelo vento. Se a dispersão é realizada por animais, o parentesco entre indivíduos mais próximos é menor. Da mesma forma, espécies com menor densidade demográfica de adultos na floresta e dispersão de sementes em espaços

limitados, possuem maior estrutura genética espacial e maior parentesco dentro de grupos. A intenção é maximizar cruzamentos preferenciais entre indivíduos não aparentados, a fim de minimizar a perda de variabilidade genética por deriva genética aleatória (Lynch & Ritland, 1999).

No ramo da ecologia comportamental, o parentesco desempenha importante papel no que diz respeito às vantagens evolutivas na prática do altruísmo, que é muitas vezes realizado se o custo para o doador excede o benefício para receptores múltiplos através do parentesco existente entre eles (Lynch & Ritland, 1999).

Geralmente, estudos de genética conservacionista ou de ecologia comportamental são realizados em populações naturais em que a genealogia entre os indivíduos é desconhecida. A única maneira de obter estimativas de parentesco em populações naturais é por meio de inferências indiretas através marcadores moleculares (Ritland, 1989; Lynch & Ritland, 1999).

Em populações naturais, existem três situações nas quais os marcadores moleculares podem ser utilizados para estimar parentesco (Ritland, 1989):

1. Em populações finitas, onde relativamente poucos alelos são suficientes para determinar o parentesco com segurança estatística;
2. Quando se utilizam marcadores multialélicos de DNA. Assim, com a análise de muitos locos é possível obter o parentesco com segurança, mesmo em um conjunto amplo de combinações de indivíduos;
3. Quando a dispersão de gametas é limitada e os indivíduos da população encontram-se fisicamente agrupados. Neste caso, indivíduos adjacentes possuem maior probabilidade de ser aparentados e, portanto, poucos locos seriam suficientes para estimar o grau de parentesco entre eles.

Com marcadores isoenzimáticos, existem problemas em se estimar o parentesco entre indivíduos devido ao pequeno número de locos disponíveis e ao número relativamente reduzido de alelos por loco. Os erros das estimativas realizadas com estes marcadores bioquímicos são exageradamente elevados, chegando a ponto de impossibilitar a distinção entre meios-irmãos e irmãos germanos. Com o advento de marcadores multialélicos de DNA, como microssatélites, os problemas referentes às estimativas de parentesco com poucos locos ficaram reduzidos (Ritland, 1996b).

Obtendo-se coeficientes de parentesco entre pares de indivíduos em seus habitats naturais, é possível ainda a realização de estudos de genética quantitativa, aprofundando o nível de conhecimento destas populações para que futuramente, se necessário, existam conhecimentos suficientes para serem aplicados em pré-melhoramento. Segundo Nass (1998)², o pré-melhoramento é a alternativa mais promissora para servir de elo de ligação entre os recursos genéticos e os programas de melhoramento genético, uma vez que o pré-melhoramento pode ser conceituado como o conjunto de atividades que visam a identificação de caracteres de interesse, presentes em materiais não cultivados

3.6. Herança quantitativa em populações naturais

A herdabilidade expressa a proporção da variância fenotípica total que é atribuída ao efeito médio de genes, esta fração determina o grau de semelhança entre parentes (Falconer & Mackay, 1997). Métodos clássicos de se estimar a herdabilidade são baseados em computar a covariância fenotípica existente sob certo grau de parentesco, e relacionar estas estimativas de covariâncias com uma combinação linear de componentes genéticos esperados sob um modelo particular.

² NASS, L. Comunicação pessoal, 1998.

A maior parte dos estudos sobre quantitativa são conduzidos em laboratórios ou casas de vegetação devido à necessidade de programas de cruzamentos controlados e controle ambiental, a fim de minimizar os erros inerentes às estimativas da variância genética (Mousseau et al., 1998). Caracteres quantitativos são, por natureza, dependentes do meio ambiente. Entretanto, a combinação do estudo de caracteres quantitativos com populações em condições naturais é rara devido aos problemas de desmembramento entre as variâncias ambientais e as variâncias genéticas aditiva e de dominância, porque as relações de parentesco entre seus indivíduos são geralmente desconhecidas (Ritland, 1989).

Já na década de 60, havia uma preocupação em se estimar herança quantitativa sem a necessidade de experimentos com progênie. Sakai & Hatakeyama (1963) descreveram uma metodologia para a estimação de herdabilidade no sentido amplo e de correlações genéticas em caracteres quantitativos de espécies florestais sem testes de progênie. Tal metodologia consistiu em avaliar os padrões de variação do meio ambiente compartilhado entre plantas de uma mesma população separando os componentes de variância e de covariância genética e ambiental para certos caracteres. Desta forma, a herdabilidade no sentido amplo e as correlações genéticas entre caracteres puderam ser avaliadas se as populações estivessem sob as seguintes condições: i) todos os indivíduos da floresta deveriam ter a mesma idade; ii) o espaçamento de plantio entre as plantas deveria ser uniforme; iii) a floresta não poderia possuir falha natural ou artificial; iv) a floresta não poderia sofrer desbastes exagerados. Este método possuía a vantagem de obter estimativas de herança quantitativa em espécies florestais, que geralmente demoram muitos anos para atingir o período de corte ou o reprodutivo, sem a necessidade de testes de progênie. A desvantagem era que, além da necessidade das condições citadas acima, com o método de Sakai e Hatakeyama (1963) não era possível a estimativa da herdabilidade no sentido restrito, onde apenas o efeito genético aditivo é considerado sobre a variância fenotípica total.

Para se obter estimativas de herdabilidade no sentido restrito a partir de correlações, dois fatores devem ser quantificados (Ritland, 1989):

1. Covariância ambiental devido ao compartilhamento do mesmo local;
2. Correlação entre locos marcadores e locos determinantes dos caracteres quantitativos.

O grande avanço proporcionado pelos marcadores moleculares neste contexto foi a possibilidade de estimar o parentesco entre indivíduos, desconsiderando a necessidade de experimentos com progênies para que um modelo particular pudesse ser estabelecido durante as estimativas (Ritland, 1996b).

O uso de marcadores genéticos no estudo de caracteres quantitativos em populações naturais é uma área quase inexplorada. Análises de caracteres quantitativos baseados em marcadores têm sido amplamente estudadas em humanos, animais e plantas domesticadas (Lander & Schork, 1994). Menos atenção tem sido dada a inferências de parâmetros quantitativos com o auxílio de marcadores moleculares em espécies não domesticadas, particularmente àquelas em seus habitats naturais (Ritland & Ritland, 1996).

As principais vantagens dessa abordagem são: i) a não necessidade de cruzamentos e testes de progênies; ii) a possibilidade de obtenção das estimativas de herança quantitativa em populações naturais, sem intervenção humana. Muitos fatores podem interferir na estimativa de coeficientes de herdabilidade em condições controladas, como a baixa competição entre plantas, a falta de estresse e a manutenção de genótipos pouco adaptados sob condições experimentais (Ritland, 2000).

O procedimento descrito por Ritland (1996a) para se estimar parâmetros de genética quantitativa em populações naturais com base em marcadores infere, em primeira instância, a herdabilidade no sentido restrito (a estimativa do coeficiente de parentesco entre as plantas é necessária para esta abordagem) e a correlação genética aditiva de caracteres

avaliados entre indivíduos que compartilham o mesmo ambiente. Posteriormente, estimativas de isolamento por distância ambiental, dominância e níveis de endogamia compartilhados podem ser obtidas. O poder estatístico para estimar os efeitos devidos a ambientes compartilhados e efeitos de endogamia é razoável. Entretanto, as estimativas da variância de dominância podem ser dificultadas sob certos padrões de parentesco.

Em estudos realizados em populações de *Mimulus guttatus* (plantas anuais), foram estimados parâmetros quantitativos das populações em condições naturais (Ritland & Ritland, 1996). Os autores obtiveram resultados superestimados para a herdabilidade em campo, comparados com a obtida pelos métodos tradicionais em condições controladas. A conclusão foi que a estimativa de herdabilidade *in situ* por este método deve ser preferencialmente aplicável a populações com estruturas significativas de micropopulações (parentesco entre vizinhos), em plantas perenes ou a plantas anuais que não podem ser cultivadas com facilidade. Ainda segundo os autores, classes de marcadores geneticamente mais informativos, isto é altamente multialélicos tais como microsatélites, seriam ideais para este tipo de abordagem.

3.7. Marcadores Microsatélites

Marcadores moleculares codominantes têm sido usados nos estudos genéticos de populações naturais, principalmente na determinação de padrões de sistema de cruzamento, fluxo gênico e estrutura genética populacional.

Entre as classes de marcadores moleculares existentes, os marcadores baseados em Sequências Simples Repetitivas (SSR) ou microsatélites são os que mais se aproximam do marcador ideal para estudos de genética de populações (Rafalski et al., 1996). Isto deve-se ao

fato de tais marcadores possuírem características extremamente favoráveis para este fim. Dentre elas destacam-se:

1. São abundantes e uniformemente distribuídos por todo o genoma;
2. São tipicamente codominantes;
3. São altamente multialélicos, apresentando o maior conteúdo informativo por loco entre todas as classes de marcadores moleculares;
4. São obtidos através de amplificação via PCR;
5. São automatizáveis em sistemas multiplex, o que permite avaliar rapidamente um grande número de indivíduos para um grande número de locos em pouco tempo;
6. Podem ser transferidos dentro de espécies de um mesmo gênero;
7. Uma vez desenvolvidos, podem ser compartilhados entre diferentes laboratórios.

Os principais fatores limitantes para a utilização de microsatélites em larga escala são o custo elevado e tecnologia necessária para o seu desenvolvimento. Via de regra, os ecologistas e geneticistas de populações não possuem as condições necessárias para o desenvolvimento destes marcadores, como, por exemplo, um laboratório equipado com aparelhos utilizados em rotinas de biologia molecular necessárias para este fim.

Durante o processo de obtenção de pares de "primers" que amplifiquem regiões repetitivas de microsatélites, são necessários passos de caracterização de abundância de diferentes motivos repetitivos ("*motifs*"), construção de bibliotecas, seqüenciamento de DNA e ampla triagem dos "primers" construídos, visando identificar locos mais informativos. Entretanto, uma vez desenvolvidos, estes "primers" podem ser rapidamente disponibilizados à comunidade científica, permitindo uma excelente integração e comparação de resultados entre laboratórios.

As principais aplicações dos marcadores SSR têm sido em estudos de mapeamento genético, genética de populações e identificação individual em

humanos, animais domésticos e plantas (Akkaya et al., 1995; Cregan et al., 1994; Evett et al., 1997; Glowatzki-Mullis et al., 1995 e Senior & Heun, 1993).

O primeiro trabalho publicado em que estas seqüências repetidas foram denominadas microssatélites foi em humanos (Litt & Luty, 1989). Já em plantas, um dos primeiros trabalhos publicados descrevendo estes marcadores foi, inesperadamente, em espécies arbóreas tropicais (Condit & Hubbell, 1991). Os autores detectaram grande abundância de dinucleotídeos repetidos do tipo AG e AC no genoma de plantas. Em um trabalho de revisão, Powell et al. (1996) descreveram que a abundância de microssatélites em animais e em humanos é muito superior à detectada em plantas. É possível encontrar pelo menos 20 pb de seqüências repetidas a cada 6 kb em mamíferos, ao passo que em plantas são encontradas em média a cada 33 kb. O tipo de dinucleotídeo repetido mais freqüente em vegetais é o AT seguido pelo AG e pelo AC (Powell et al., 1996); entretanto, os microssatélites desenvolvidos para motivos AT são raros devido à autocomplementaridade das sondas utilizadas durante o desenvolvimento dos marcadores com este tipo de dinucleotídeos repetidos (Rafalski et al., 1996).

A quantidade de AG e de AC em plantas varia de espécie para espécie; em *Pinus*, por exemplo, a quantidade de AC é duas vezes maior que de AG (Echt & May-Marquardt, 1997). Microssatélites de dinucleotídeos são mais abundantes que tri e tetranucleotídeos, daí o motivo de uma maior quantidade de trabalhos apresentando “primers” que amplificam estas regiões.

Atualmente, muitos locos SSR estão descritos para espécies arbóreas como *Eucalyptus* (Brondani et al., 1998), *Swietenia humilis* (White & Powell, 1997), *Quercus macrocarpa* (Dow et al., 1995), *Pithecellobium elegans* (Chase et al., 1996b), *Caryocar brasiliense* (Collevatti et al., 1999) entre outras. Com exceção dos SSR descritos para *Eucalyptus*, a maioria dos locos microssatélites desenvolvidos para espécies florestais têm a finalidade de

serem utilizados em estudos de evolução, conservação e genética de populações. Neste contexto, Hedrick (1999) fez algumas considerações sobre o uso destes marcadores genéticos em relação a medidas de diferenciação, distâncias genéticas e significância estatística. Segundo o autor, estes marcadores, por serem altamente multialélicos, apresentam resultados surpreendentes para questões evolutivas e conservacionistas. Porém, a significância de tais resultados deve ser interpretada com cuidado, uma vez que medidas como distâncias e diferenciação genética são altamente influenciáveis pelo nível de heterozigosidade apresentada pelos marcadores. Como microssatélites são hipervariáveis podem, muitas vezes, apresentar significância estatística que não corresponde à verdade biológica.

4. DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA *Euterpe edulis* MART. E *Euterpe oleracea* MART.

Microsatellite markers for Heart of Palm - *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart.
(Arecaceae)

F. A. Gaiotto^{†*}; R. P. V. Brondani^{*}; D. Grattapaglia[#]

*Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Sain Parque Rural C.P.
02372 Brasília-DF 70770-900. Brazil.

[†]Departamento de Genética - ESALQ/USP – Av. Pádua Dias, 11 C.P.83
Piracicaba-SP 13400-970. Brazil.

[#]Laboratório de Biotecnologia Genômica - Universidade Católica de Brasília –
SGAN 916 Módulo B Brasília D.F.

Palavras-chave: SSR, microssatélite, *Euterpe*, árvores tropicais,
Arecaceae

*Publicação submetida e aceita pela: ***Molecular Ecology***

RESUMO

Uma bateria de 18 locos marcadores do tipo microssatélite altamente polimórfica foi desenvolvida para *Euterpe edulis* Mart. A estratégia utilizada foi a de enriquecimento de biblioteca genômica. A seleção de clones com as seqüências simples repetidas foi efetuada pelo procedimento conhecido como PCR ancorado. Realizou-se esta etapa para se determinar o tamanho e a posição do inserto dentro do clone antes do processo de sequenciamento. A transferibilidade de sete dos 18 locos obtidos foi possível para a espécie *Euterpe oleracea* Mart. A eficiência final na obtenção dos "primers" que amplificam regiões repetidas de dinucleotídeos AG/CT foi de 3,78%. A caracterização destes locos foi realizada em géis, de poliacrilamida, de alta resolução. A otimização destes marcadores para a obtenção dos locos em sistemas multiplex foi realizada de maneira a resolver em um único gel, seis locos simultaneamente. Todos os locos SSR apresentaram-se altamente polimórficos, produzindo um total de 192 alelos com uma média de 10,6 alelos por loco.

Parâmetros de informação genética como H_e (diversidade gênica), H_o (heterozigosidade observada), I (probabilidade de identidade) e Q (probabilidade de exclusão de paternidade) foram obtidos. Os resultados obtidos para estes parâmetros são indicativos do poder dessa bateria de marcadores microssatélites para estudos genéticos como: testes de paternidade, estimação de fluxo gênico e de coeficientes de parentesco entre árvores situadas em populações naturais.

4.1. INTRODUÇÃO

Marcadores moleculares codominantes têm sido usados em estudos genéticos de populações naturais, principalmente na determinação de padrões de sistema reprodutivo e fluxo gênico. Entre as classes de marcadores moleculares existentes, os marcadores baseados em Sequências Simples Repetitivas (SSR), ou microssatélites, são os que mais se aproximam do marcador ideal para estudos de genética de populações. São marcadores abundantes e uniformemente distribuídos por todo o genoma, codominantes e altamente multialélicos, apresentando o maior conteúdo informativo por loco gênico entre todas as classes de marcadores moleculares. Pequenas quantidades de DNA são suficientes para a análise desses marcadores. Além disso, podem ser transferidos entre espécies de um mesmo gênero. Polimorfismos de SSR são analisados via PCR (reação da polimerase em cadeia), podendo ser automatizáveis em sistemas multiplex, o que permite a rápida avaliação de muitos indivíduos para um grande número de locos.

O primeiro trabalho publicado onde estas seqüências repetidas foram denominadas microssatélites, foi realizado em humanos (Litt & Luty, 1989). Já em plantas, estes marcadores foram pioneiramente detectados em milho e espécies arbóreas (Condit & Hubbell, 1991). Atualmente, eles vêm sendo empregados em vários estudos de mapeamento genético, genética de populações e identificação individual em humanos, animais domésticos e plantas (Senior & Heun, 1993; Cregan et al., 1994; Glowatzki-Mullis et al., 1995; Akkaya et al., 1995; Evett et al., 1997; Collevatti et al., 2001).

O que limita a utilização de microssatélites, de forma ampla, é o custo e a tecnologia necessários para o seu desenvolvimento. É exigido um bom

domínio de técnicas de biologia molecular, que normalmente não estão ao alcance de geneticistas de populações. Para a obtenção de pares de "primers" adequados, são necessários passos de caracterização de abundância de diferentes "motivos" que se repetem ao longo do genoma, construção de bibliotecas, seqüenciamento do DNA e ampla triagem de "primers" construídos visando identificar locos mais informativos. Entretanto, uma vez desenvolvidos, estes "primers" podem ser rapidamente disponibilizados à comunidade científica, permitindo uma excelente integração e comparação de resultados entre laboratórios. Além disso, embora demande tecnologias moleculares refinadas durante seu desenvolvimento, os marcadores SSR compensam tal esforço pela quantidade de informações genéticas geradas.

A espécie *E. edulis* Mart. pertence à família Arecaceae fazendo parte da composição florística da Floresta Tropical Atlântica Brasileira. Ocorre desde o sul da Bahia (15°S) até o norte do Rio Grande do Sul (30°S). Palmeiras de *E. edulis* são típicas de locais úmidos e sombreados. Seus exemplares são geralmente encontrados em regiões de mata ciliar (Floresta Umbrófila Densa). Tanto *E. edulis* (palmitreiro) quanto *E. oleracea* (açazeiro) são produtoras de palmito; entretanto, a produtividade e a qualidade do produto de *E. edulis* são muito superiores aos de *E. oleracea*. A vantagem do açazeiro sobre o palmitreiro é que a colheita de palmito não implica na morte da planta, uma vez que esta perfilha. No caso do *E. edulis*, a extração do palmito implica no corte da planta total.

Devido ao elevado valor comercial do palmito de boa qualidade e de seus produtos derivados, uma exploração intensiva e descontrolada deste recurso natural tem ocorrido nas principais áreas de ocorrência desta palmeira (Orlande *et al*, 1996). Para o desenvolvimento de estratégias de conservação e pré-melhoramento em populações naturais, é fundamental, primeiramente, a realização de estudos detalhados de genética de populações, incluindo a determinação do sistema de cruzamento e o parentesco existente entre os indivíduos em condições naturais da espécie.

Como parte de um projeto para se estimar os coeficientes de herdabilidade de caracteres relacionados ao crescimento de *E. edulis* em populações naturais (Ritland, 1996a), o objetivo deste trabalho foi o desenvolver e caracterizar um amplo conjunto de marcadores do tipo microsatélite, que permitisse estimar com precisão o coeficiente de parentesco entre árvores em condições naturais (Lynch & Ritland, 1999).

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Desenvolvimento de Marcadores Microsatélites

Os marcadores microsatélites foram desenvolvidos e otimizados de acordo com protocolos descritos anteriormente (Brondani et al. 1998; Collevatti et al, 1999). O DNA genômico de um único indivíduo de *E. edulis* foi digerido com enzima de restrição *Sau3A*. Fragmentos entre 300 e 800 pares de base foram capturados em uma membrana de nylon e ligados a adaptadores *Sau3A* específicos. Os clones contendo DNA abundante em AG/CT foram selecionados através da hibridação destes fragmentos com biotina e oligonucleotídeos de poli AG/CT ligados a contas magnéticas. Através da atração das contas magnéticas ligadas ao DNA de interesse por imã, os fragmentos ricos em regiões microsatélites foram recuperados. Este processo é chamado de enriquecimento da biblioteca genômica para microsatélites do tipo AG/CT. Para certificar-se de que a biblioteca estava realmente enriquecida, foi realizado um "Southern Blot" e a membrana com os fragmentos de DNA ricos em microsatélites foi hibridizada com sonda de poli AG marcada com Digoxigenina-11-dUTP e exposta ao filme de raio-X.

O DNA recuperado foi clonado em plasmídeo vetor pGEM^T (Stratagene, CA). Os transformantes foram obtidos através de eletroporação em *Escherichia coli*. As colônias de bactérias transformadas com o DNA de *E. edulis* cresceram em placas de Petri a 37°C por 14 horas. Uma réplica da placa de Petri com as colônias transformadas foi feita em

membranas de nylon (Hybond N, Amersham Pharmacia) depositadas cuidadosamente sobre meio de cultura. Após o crescimento, foi realizado o rompimento da membrana celular; a desnaturação, a neutralização e a fixação do DNA na membrana através de um processo denominado "cross link" por luz UV. Em seguida, foi realizada a hibridização das membranas com sondas de poli AG marcadas com Digoxigenina-11-dUTP para a detecção das colônias recombinantes. As membranas foram expostas em filmes de raio-X por três ou quatro horas a 37°C. Os clones positivos foram capturados e deixados para crescer em meio de cultura *LB* líquido com ampicilina. A estratégia de PCR ancorado foi utilizada para determinar o tamanho aproximado do inserto e a posição do SSR dentro do clone (Figura 1).

Figura 1: Esquema do PCR ancorado. Trata-se de cinco reações de PCR. Os números 1 e 2 representam os "primers" que amplificam todo o vetor. Os fragmentos amplificados pelos "primers" 1+4 e 2+3 representam uma orientação do SSR (AG/CT, por exemplo). Da mesma forma os amplificados pelos "primers" 1+3 e 2+4 representam a outra possível orientação (CT/AG).

O DNA plasmidial foi extraído e seqüenciado em seqüenciador automático do tipo ABI 377 (Applied Biosystems, CA). Oligonucleotídeos

complementares às seqüências que flanqueiam as regiões de microssatélites foram desenhados com o auxílio do programa "primer" (Lincoln *et al*, 1991).

4.2.2. Condições de Amplificação

O coquetel para o PCR foi composto por 7,5 ng de DNA genômico, 250 μ M de dNTP, 0,75 μ M de $MgCl_2$, tampão para PCR 1X (10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1,5 mM de $MgCl_2$, pH 8,3), 2,5 μ g/ μ l de BSA, 0,2 μ M de cada "primer", sendo um deles marcado com fluorescência e 1U de *Taq* DNA polimerase (Gibco). As amplificações foram realizadas utilizando-se termociclador do tipo MJ Research PTC-100, programado para o seguinte protocolo: 96°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento específica para cada par de "primers" (T_a °C) (veja tabela 1) por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, terminando com 7 minutos a 72°C.

Uma triagem dos melhores locos microssatélites foi realizada com base na qualidade do produto amplificado (maior nitidez, elevado número de alelos e ausência de produtos secundários de amplificação). A seleção dos locos foi realizada em duas etapas: i) em gel de agarose e visualização do produto amplificado em luz UV, coloração com brometo de etídio e ii) em gel de poliacrilamida utilizando-se coloração com nitrato de prata.

Após a seleção dos melhores locos SSR, um "primer" (*forward*) de cada par foi marcado com fluorocromos específicos (6-FAM=azul, TET=verde ou HEX=amarelo) para que pudessem ser analisados em ensaios multiplex em gel desnaturante de alta resolução (poliacrilamida) no seqüenciador automático de DNA (ABI 377 / Applied Biosystems, CA). Com esta técnica, os tamanhos dos alelos puderam ser determinados de maneira semi-automatizada.

Para a otimização de ensaios multiplex, foram realizadas amplificações e eletroforeses combinadas de acordo com a temperatura de anelamento dos "primers", suas cores de fluorescência e a amplitude alélica

dos locos, de modo a maximizar a quantidade de locos amplificados simultaneamente (em uma única PCR) e que pudessem ser avaliados em eletroforese única. Foram realizadas ainda diluições das reações de PCR de 1:5 e 1:10 para melhorar a interpretação dos tamanhos de alelos de cada loco, uma vez que o sistema de leitura do seqüenciador automático (laser) é muito sensível, mesmo às pequenas quantidades de fluorescência utilizadas nas reações (10^{-6} moles/fragmento de DNA) (Mitchell et al., 1997).

Os tamanhos dos alelos foram determinados através do padrão de DNA de tamanho conhecido (Rox-500/ABI), com o auxílio dos programas GeneScan (ABI) e Genotyper (ABI).

4.2.3. Material Vegetal e Análise de Dados

A caracterização dos locos SSR desenvolvidos foi realizada com base em duas populações de *E. edulis* de Matas de Galeria localizadas em áreas de preservação na região de Brasília – DF, a saber: i) Parque Nacional de Brasília (PNB) (15°45'48"S, 47°58'80"W) e ii) Reserva Ecológica do Roncador, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (15°56'26"S, 47°53'37"W). De cada população, foram coletadas folhas frescas de 33 indivíduos adultos escolhidos aleatoriamente para a extração de DNA, segundo o método de Ferreira & Grattapaglia (1995).

As estimativas que caracterizam os locos, como número de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_o) e diversidade gênica (H_e) foram obtidas com o auxílio do programa GDA (Lewis & Zaykin 2000). Além disso, testes de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e ao desequilíbrio de ligação entre pares de locos foram realizados com esse programa.

As estimativas de quantidade de informação genética I (probabilidade de identidade) e Q (probabilidade de exclusão de paternidade) foram obtidas com base nos modelos de Paetkau et al. (1995) e Weir (1996),

respectivamente. A probabilidade de identidade (I) corresponde à probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso apresentarem o mesmo genótipo. A probabilidade de exclusão de paternidade (Q) indica o poder com o qual um loco é capaz de excluir um indivíduo de ser parental de outro. Os valores multiloco de I e Q foram estimados, através da regra multiplicativa, aplicada aos locos não ligados e em EHW.

Os testes de transferibilidade de locos SSR de *E. edulis* (palmito) para *E. oleracea* (açaí) foram realizados com base no DNA de 32 indivíduos adultos de *E. oleracea*, coletados na Floresta Nacional de Caxiuanã, situada entre os municípios de Melgaço e Portel, à 400 km de Belém/PA (região amazônica). As estimativas de H_e , H_o , A , I e Q não foram estimadas para os indivíduos de *E. oleracea*, uma vez que a transferibilidade de "primers" de microssatélite entre estas espécies foi caracterizada apenas com base na produção ou não de produtos de amplificação de DNA de açaí a partir de PCR realizada com "primers" desenvolvidos para palmito.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o processo de hibridização com sonda marcada, foram selecionadas 475 colônias consideradas positivas para seqüências repetidas de $(AG)_n$. A estratégia de PCR ancorado (Figura 2) indicou que 170 (35,8%) dessas colônias possuíam regiões de microssatélites com tamanho e posição adequados no inserto para serem seqüenciados, de tal maneira que, posteriormente, o desenho de "primers" nas regiões flangeadoras do microssatélite fosse possível. Dos 170 clones positivos seqüenciados, 64 (37,6%) foram utilizados no desenho de pares de "primers" (Figura 3). Após a otimização dos locos SSR, 18 pares de "primers" (26,9%) foram efetivamente utilizados nas análises genéticas. Assim, a eficiência final no desenvolvimento de marcadores microssatélites para *E. edulis* foi de 3,78%. A eficiência final obtida no desenvolvimento foi superior às obtidas em outros trabalhos (Chase et al., 1996; Condit & Hubbell, 1991; Echt & May-

Marquardt, 1997). O que diferencia o resultado obtido no desenvolvimento dos marcadores é a estratégia de enriquecimento da biblioteca genômica para seqüências repetidas, utilizada aqui e em outros trabalhos similares (Brondani et al, 1998, Collevatti et al., 1999, Powell et al., 1996).

Figura 2: PCR ancorado onde cada primeira coluna, do conjunto de cinco, representa o fragmento total do vetor amplificado. Nas outras quatro colunas, espera-se que apenas duas apresentem fragmentos (ou a 2 e 3, ou a 4 e 5), dependendo da orientação do fragmento SSR. O tamanho do fragmento é avaliado através da sua comparação com o DNA padrão de tamanho conhecido (Ladder). Neste exemplo apenas os clones numerados com 1,2,3,4,5,6,7 e 10 foram levados para o seqüenciador automático por possuírem tamanhos adequados para o desenho de "primers" SSR.

Figura 3: Gel de seqüenciamento (A) e eletroferograma (B) onde estão representadas regiões de microsatélite em *E. edulis* (setas).

As temperaturas de anelamento dos pares de "primers" e as amplitudes alélicas dos locos (Tabela 1) foram obtidas durante o processo de otimização microsatélites para análise genética. Os produtos amplificados via PCR foram interpretados e analisados primeiramente em gel de agarose 3,5%, coloração com brometo de etídio e, posteriormente, para melhor visualização dos alelos, em gel desnaturante, de alta resolução, de poliacrilamida, coloração com nitrato de prata (Figura 4). A seleção dos 18

melhores pares de "primers" foi realizada nesta etapa, para que posteriormente fossem marcados com fluorescência.

O número de repetições do motivo (AG/CT) foi bastante homogêneo nos locos selecionados, variando entre 11 e 27 dinucleotídeos repetidos (Tabela1). Weber (1990) classificou os microsatélites de acordo com as características dos motivos que se repetem em cada loco em: i) perfeitos, quando não apresentam nenhuma interrupção nos motivos repetidos; ii) imperfeitos, quando apresentam interrupção e iii) compostos, quando são observados dois tipos diferentes de motivos se repetindo em *tandem*. De acordo com esta classificação, 15 (83,33%) dos 18 SSR desenvolvidos para *E. edulis* foram do tipo perfeito, um (5,55%) foi do tipo imperfeito (loco EE3) e dois (11,11%) foram compostos (locos EE23 e EE41) (Tabela 1).

Figura 4: "A": SSR de *E. edulis* visualizados em gel de agarose 3,5%, coloração com brometo de etídio. "B": locos SSR visualizados em gel de poliacrilamida, coloração com nitrato de prata.

As seqüências dos pares de "primers" e os respectivos números de repetições de dinucleotídeos amplificadas em cada loco estão descritos na Tabela 1. Dos 18 locos microssatélites desenvolvidos para *E. edulis*, sete apresentaram produtos de amplificação polimórficos e claramente interpretáveis em *E. oleracea* (Tabela 1) (Figura 5). A transferibilidade de "primers" microssatélite entre estas espécies, com importância ecológica e econômica, é de grande valia para pesquisadores que pretendem estudar ou trabalhar com *E. oleracea*, pois com esses sete locos já é possível se obter parâmetros genéticos populacionais para a espécie, tais como sistema reprodutivo, fluxo gênico, estrutura genética de populações, entre outros.

Com a otimização dos 18 locos para serem visualizados em sistemas multiplex, foi possível avaliar, simultaneamente, seis locos SSR em um único gel de alta resolução. Desta maneira, com apenas três hexaplex (três géis), foi possível obter os genótipos de grupos de indivíduos de *E. edulis* para os 18 locos SSR, reduzindo, desta forma, os custos e o tempo gastos nas análises laboratoriais. As combinações dos locos que formaram cada hexaplex estão descritas na Tabela 2.

A diluição da reação de PCR de 1:5 foi a que apresentou melhores resultados na análise dos dados no seqüenciador automático de DNA (Figura 6).

A caracterização dos locos microssatélites foi realizada a partir dos dados obtidos nos ensaios multiplex. Todos os locos SSR apresentaram-se altamente polimórficos, produzindo um total de 192 alelos com uma média de 10,6 alelos por loco. O elevado grau de polimorfismo é uma das características deste tipo de marcador. Isto ocorre porque as regiões repetitivas evoluem de maneira diferenciada do resto do genoma. Tais regiões chegam a possuir, em humanos, taxas de mutação de até 10^{-4} (Weber & Wong, 1993), enquanto que as demais regiões genômicas mutam com taxa média de 10^{-6} (Kempthorne, 1957).

O grande número de alelos obtidos para cada loco (Tabela 2) é um indicativo da superioridade deste tipo de marcador, quando comparado com

qualquer outro conhecido. Além disso, os valores de heterozigosidade observada para os diferentes locos apresentaram-se muito superiores aos valores de H_o obtidos com marcadores isoenzimáticos, que são os mais comumente utilizados em estudos genéticos de populações naturais, de várias espécies tropicais (Alvarez-Buylla, 1996; Chase et al., 1996; Loiselle et al., 1995; Meagher, 1986; Reis, 1996; entre outros). A diversidade gênica média (H_e) estimada com SSR (Tabela 2) apresentou-se muito maior (0,77) que a estimada para *E. edulis* com marcadores isoenzimáticos (0,45) (Reis, 1996), confirmando sua potencialidade para estudos de genética quantitativa e de populações. Esta bateria de marcadores microsatélites também mostrou-se altamente eficiente para explicar a diversidade gênica, pois detectou 85,55% da máxima diversidade possível com 10,6 alelos (0,90), considerando que a $H_{e\max.} = (A - 1)/A$.

Os locos EE15, EE32, EE41, EE54 e EE59 não aderiram às proporções de Hardy-Weinberg, possivelmente devido a efeitos de amostragem ou a presença de alelos nulos. Com testes de desequilíbrio de ligação foi possível observar que os 18 locos não são significativamente independentes entre si. Porém uma bateria de seis marcadores (EE2, EE3, EE8, EE23, EE43 e EE45), todos em EHW e equilíbrio de ligação pôde ser selecionada para a obtenção de estimativas de informação genética multiloco.

O poder de resolução deste tipo de marcador foi demonstrado, neste trabalho, no que diz respeito a testes de paternidade e identificação individual. A partir dessa bateria de seis locos SSR selecionados, foi possível estimar a probabilidade de exclusão de paternidade (Q) e a probabilidade de identidade (I), combinadas entre os seis locos. A estimativa multiloco de I foi de $1,05 \times 10^{-6}$, indicando que a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso apresentarem o mesmo genótipo é basicamente nula. Da mesma forma, a estimativa multiloco de Q foi de 0,991, indicando o poder com o qual essa bateria de apenas seis locos SSR é capaz de excluir um indivíduo de ser parental de outro. As estimativas de I e Q dos 18 locos obtidas individualmente estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 1: Sequência dos "primers" que amplificam locos microssatélites de *E. edulis* com as respectivas repetições, amplitudes alélicas e temperaturas de anelamento (T_a).

Locos SSR	nº de repetições	Sequência dos "primers" (5'- 3')	Amplitude alélica (bp)	Código de acesso no "GenBank"	T_a (°C)
EE2*	(AG) ₂₂	CCAAGgACgCAATCTCAA AgCgAggCAGAACACgTA	82-110	AF328879	62
EE3*	(AG) ₁₁ (AG) ₁₆	TTCgCgCACACTgAgAg ggTAGCgTTgATTggTCC	194-210	AF328881	56
EE5	(AG) ₂₄	gAgAACACATAAgCTgC gCTTCAGAAATTAaggACA	102-136	AF328882	56
EE8*	(AG) ₂₀	gTATTCCAATgTgCTCACAg gTgCAGTAaggCTTCTAgTACC	110-132	AF328872	58
EE9	(AG) ₁₉	TTCTCTCgCATgCCTCg gCCACACACACACAgTAgaATC	90-110	AF328880	62
EE15*	(AG) ₂₁	CCACACAgACACgCAGATAg CCTCATgAAgCATCgACCT	140-162	AF328873	64
EE23*	(A) ₁₄ (AG) ₂₃	gTTCTgCgATTCATACTCCTg TACgAACCAAgATggAgCAA	100-132	AF328877	58
EE25	(AG) ₂₆	CggATCCTgAgACTgAATTg CCACACAgATTCAgAgCACA	156-190	AF328878	58
EE32	(AG) ₂₀	CCgCCTggTgAgCCTCT CAgTgCACCAAggAACTCCAT	204-234	AF328883	62
EE41	(AG) ₂₁ (TG) ₁₃	CCTTgCAGTTTATggCTACg CCATTgAgAgggAATgAggT	170-190	AF328884	48
EE43*	(AG) ₁₆	gCgAAAggCTAACAAcGTTAT AgCgAACCAACCAAgAAgAC	118-132	AF328886	56
EE45	(AG) ₂₈	AAAgAAATTggCgTgACATC AACCAGTCTTCTCCCTCTCg	70-154	AF328887	56
EE47	(AG) ₂₀	CgAAATCAATggTTTCAGTg AATTATTgTTgTgggCAGC	214-246	AF328874	56
EE48	(AG) ₂₇	CCTACCATTACgTACTgTCg CAATATCAAgCTCATCCATC	210-266	AF328875	56
EE52	(AG) ₂₂	TTCTgTggAgAgTCAATCATC AATCTgACAaggCCTCAAC	230-260	AF328888	56
EE54*	(AG) ₂₅	CATgTATCTAAggAACAAgg CTgTgCTCTCTCATTCTCA	140-160	AF328876	56
EE59	(AG) ₁₆	AACCTCTCTTTggCCTA CTTggCATACTggAACCC	84-128	AF328885	56
EE63	(AG) ₁₈	CCgATATgCTCAAATCAATg ACgAgAggAATCAAAGAACCC	106-132	AF328889	56

* Locos transferíveis para *E. oleracea*.

Figura 5: Transferibilidade de locos SSR entre as espécies *E.eduliss* (EE) e *E.oleracea* (EO). Os mesmos locos e os mesmo indivíduos estão sendo visualizados em agarose (A) e em poliacrilamida (B).

Figura 6: Exemplo de gel (A) e eletroferogramas (B) de alguns locos SSR de *E. edulis* fluorescentes após a eletroforese no seqüenciador automático de DNA (ensaio multiplex) e a análise pelos programas que determinam o tamanho de cada fragmento.

Tabela 2: Locos microssatélites com as respectivas cores de fluorocromo e combinações nos sistemas multiplex. Número de alelos por loco (A), e estimativas da diversidade gênica (H_e), heterozigosidade observada (H_o), probabilidade de identidade genética (I) e probabilidade de exclusão de paternidade (Q), com base em 66 indivíduos adultos não relacionados.

Loco	cor	combinações	A	H_e	H_o	I	Q
EE2	azul	Hexaplex 1	12	0,81	0,73	0,06	0,66
EE3	amarelo	Hexaplex 1	08	0,42	0,42	0,35	0,26
EE5	azul	Hexaplex 3	13	0,82	0,75	0,06	0,65
EE8	amarelo	Hexaplex 1	08	0,74	0,75	0,11	0,51
EE9	amarelo	Hexaplex 2	02	0,50	0,94	0,38	0,19
EE15	azul	Hexaplex 1	12	0,82	0,98	0,06	0,64
EE23	verde	Hexaplex 1	13	0,85	0,78	0,04	0,70
EE25	amarelo	Hexaplex 3	09	0,82	0,73	0,06	0,63
EE32	azul	Hexaplex 1	10	0,78	0,48	0,08	0,59
EE41	verde	Hexaplex 3	06	0,76	0,55	0,10	0,54
EE43	verde	Hexaplex 2	05	0,65	0,70	0,19	0,38
EE45	azul	Hexaplex 2	14	0,79	0,73	0,06	0,62
EE47	azul	Hexaplex 3	11	0,84	0,80	0,05	0,67
EE48	azul	Hexaplex 2	19	0,88	0,59	0,03	0,76
EE52	verde	Hexaplex 2	14	0,87	0,74	0,03	0,74
EE54	amarelo	Hexaplex 2	09	0,77	0,42	0,09	0,56
EE59	verde	Hexaplex 3	12	0,81	0,61	0,06	0,63
EE63	amarelo	Hexaplex 3	15	0,88	0,74	0,03	0,75
média			10,6	0,77	0,69		

Essa poderosa ferramenta foi desenvolvida com a finalidade de estudar parentesco em populações naturais de *E. edulis*, para se estimar parâmetros de herança quantitativa de caracteres relacionados à produção de palmito, de maneira que a seleção de uma população base de melhoramento da espécie possa ser estabelecida ainda na fase de coleta de sementes em populações naturais.

5. ESTRUTURA GENÉTICA, SISTEMA REPRODUTIVO E FLUXO GÊNICO DE LONGA DISTÂNCIA EM PALMITEIRO (*Euterpe edulis* MART. – ARECACEAE)

Genetic Structure, Mating System and Long Gene Flow in Heart of Palm (*Euterpe edulis* Mart.- Arecaceae)

F. A. Gaiotto[†]; D. Grattapaglia[#]; R. Vencovsky[†]

[†] Departamento de Genética. ESALQ/USP – Av. Pádua Dias, 11 C.P.83 Piracicaba–SP 13400-970. Brazil.

[#] Laboratório de Biotecnologia Genômica - Universidade Católica de Brasília – SGAN 916 Módulo B Brasília - D.F. Brazil

Palavras-chave: fluxo gênico, microsatélite, taxa de cruzamento, diversidade genética, *Euterpe*, Arecaceae.

RESUMO

Um estudo detalhado da genética de duas populações de palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart. – Arecaceae) foi efetuado. Esta palmeira possui grande importância na conservação da Floresta Tropical Atlântica por ser considerada espécie chave, pois seus frutos servem de alimento para muitas espécies de pássaros e mamíferos durante vários meses do ano. Apesar de sua importância ecológica, esta palmeira vem sendo explorada em larga escala devido ao seu principal produto, o palmito, que possui elevado valor econômico.

Duas populações de *E. edulis* distantes 22 km foram estudadas com o auxílio de 18 locos microssatélites. A diversidade alélica média (H_e) e a heterozigosidade observada (H_o) apresentaram valores elevados, 0,749 e 0,690, respectivamente. Os parâmetros $F_{ST}=0,061$; $F_{IS}=0,117$ e $F_{IT}=0,171$ foram estimados sob o modelo de alelos infinitos (*infinitesimal allele model*), ao passo que o valor $R_{ST}=0,065$ foi obtido sob o modelo de mutação aos saltos (*step-wise mutation model*). Ambas as medidas de diferenciação genética foram significativas estatisticamente, apesar de seus baixos valores. As, relativamente baixas, estimativas de diferenciação genética sugerem um fluxo gênico elevado entre essas populações. O parâmetro Nm estimado a partir do valor de R_{ST} foi de 3,374 migrantes por geração.

A estrutura genética parece ser o resultado do balanço entre a polinização cruzada e o longo movimento de genes, que reduz a diferenciação genética entre as populações. O modelo de acasalamento misto foi usado para avaliar o sistema de reprodução de *E. edulis* nas populações amostradas. Os resultados mostraram que as populações em estudo são altamente alogâmicas, apresentando elevadas probabilidades de gerarem irmãos germanos dentro de famílias de polinização aberta. Além disso, uma elevada variação no sucesso reprodutivo entre adultos dentro de populações foi detectada. Surpreendentemente dois indivíduos adultos foram declarados progenitores mais prováveis de plântulas distantes 22 km,

com probabilidade de paternidade/maternidade superior a 99,99% e, superior a 93% quando foram consideradas probabilidades, *a priori*, extremamente conservativas nos testes de paternidade. Uma longa distância de fluxo gênico como a encontrada nesse trabalho não havia sido reportada antes para qualquer espécie arbórea tropical.

5.1. INTRODUÇÃO

O palmito, produto extraído do ápice caulinar de algumas palmeiras, é muito apreciado pela cozinha brasileira e mundial. A palmeira *Euterpe edulis* Mart. é a que produz palmito de melhor paladar. Esta espécie pode ser encontrada em toda a extensão da Floresta Atlântica, do Sul ao Nordeste do Brasil, bem como em regiões de matas de galeria do Cerrado brasileiro. *E. edulis* leva de oito a dez anos para atingir o tamanho comercial adequado para o corte e colheita do palmito. A extração do palmito leva a morte da planta, pois essa palmeira apresenta estipe único. A alta demanda de palmito, devido ao seu valor comercial, e os pequenos investimentos em práticas adequadas de manejo para a espécie têm resultado em sérias devastações das populações existentes em certas áreas da Floresta Atlântica (Orlande et al. 1996; Galetti & Fernandez 1998).

As inflorescências de *E. edulis* são formadas por várias tríades, contendo duas flores masculinas e uma flor feminina cada, com forte protandria. Este sistema previne a autogamia. Aparentemente, pequenos insetos são os responsáveis pela polinização da espécie, sendo o principal deles, uma pequena vespa - *Trigona spinipes* - que pratica vôos curtos de aproximadamente 50 a 100 metros. Entretanto, essa palmeira pode ser também polinizada pelo vento (Reis et al. 1993). A produção de flores e frutos em *E. edulis* dura mais de quatro meses por ano (Reis et al. 1993). Devido à grande quantidade de frutos produzidos por ano, essa palmeira é uma importante fonte de alimento para mamíferos e pássaros. Por isso é considerada uma espécie-chave (Terborgh, 1986).

A dinâmica populacional pode ser afetada por vários fatores evolucionários, tais como seleção e deriva genética podendo, portanto, ter importantes consequências sobre a estrutura genética das populações. Entretanto, a magnitude dos efeitos da deriva e seleção nos padrões de variação genética é dependente da habilidade reprodutiva dos indivíduos da

população e seu impacto no fluxo gênico. A relação entre dispersão gênica e os níveis de diversidade genética dentro de populações pode ser investigada através de estudos de sistema de reprodução e mecanismos de dispersão de pólen (Hamrick & Nason 1996). Existem diferentes métodos para se estudar o movimento de genes entre e dentro de populações. Um método direto de avaliar o fluxo gênico em populações naturais é através de testes de paternidade entre os indivíduos da população, com baterias de marcadores microssatélites altamente informativos.

Marcadores microssatélites, também conhecidos como seqüências simples repetidas (SSR), têm sido usados em estudos de genética de populações naturais de espécies tropicais (Chase et al. 1996a,b; *Dayanandan* et al. 1999; Collevatti et al. 2001). Isto ocorre porque tais marcadores possuem forte poder de discriminação, essencial nestes estudos. Algumas de suas importantes características podem ser citadas: i) são altamente polimórficos; ii) multialélicos; iii) codominantes; iv) abundantes e uniformemente distribuídos por todo o genoma e v) facilmente obtido através de ensaios de PCR.

Em angiospermas, o movimento de pólen e sementes pode ser influenciado pelos padrões de reprodução e fluxo gênico dentro e entre populações (Boshier et al. 1995). O conhecimento detalhado da gênese da Floresta Tropical e, em particular, da sua biologia reprodutiva, podem auxiliar na definição de estratégias de conservação deste ecossistema. Enquanto a maioria dos trabalhos relatando sistemas reprodutivos em árvores tropicais referem-se a espécies da América Central, particularmente do Panamá, Costa Rica e México, na América do Norte. Poucos estudos foram publicados reportando dados de espécies arbóreas brasileiras. Dessa forma, apesar de necessário, ainda é precário o conhecimento detalhado de todos os aspectos reprodutivos, para um bom entendimento da distribuição da diversidade gênica entre e dentro de indivíduos, do fluxo gênico e da resultante estruturação das populações em espécies arbóreas do Brasil.

A conservação e manejo de populações naturais de *E. edulis* somente será eficiente através do conhecimento detalhado da genética de suas populações remanescentes. Com base nesses propósitos principais, o objetivo deste trabalho foi estudar detalhadamente a genética de duas populações de *E. edulis* de matas de galeria do Cerrado brasileiro, com ênfase no sistema reprodutivo, paternidade, fluxo gênico e parâmetros de diferenciação genética entre e dentro das populações, utilizando marcadores microsatélites.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Material Vegetal

Foram amostradas duas populações de *E. edulis* de matas de galeria do Cerrado brasileiro (Figura 1). O material vegetal foi coletado no Parque Nacional de Brasília (PNB) (15°45'48"S, 47°58'80"W), e na Reserva Ecológica do Roncador, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (15°56'26"S, 47°53'37"W). As duas populações estão localizadas na região de Brasília (DF) e a distância entre elas é de 22 km e 150 metros em linha reta.

Para o estudo do sistema reprodutivo, foram coletadas sementes de 13 adultos escolhidos aleatoriamente no IBGE e de 12 adultos do PNB. Doze filhas de cada adulto cresceram em casa de vegetação, sob condições ambientais controladas. Estas famílias maternas foram utilizadas na estimativa da taxa de cruzamento das populações amostradas.

Figura 1: Aspecto das Matas de Galeria onde os indivíduos adultos e regenerantes de *E. edulis* foram amostrados.

Para o estudo de estrutura genética e determinação da paternidade, foram coletadas folhas de adultos e de regenerantes de até um ano de idade nas populações naturais de *E. edulis* (Figura 2). Como os regenerantes foram amostrados por toda a área de estudo determinada, não havia nenhum conhecimento acerca de seus progenitores (feminino e masculino). Por essa razão, a análise de "paternidade" foi realizada para determinar tanto o progenitor masculino, quanto o feminino para cada indivíduo regenerante amostrado nas matas de galeria. No PNB foram coletadas folhas de 111 adultos e de 231 regenerantes para a extração de DNA, enquanto

que no IBGE foram amostrados 33 adultos e 208 regenerantes. A localização relativa dos adultos de ambas populações está representada na Figura 3.

Figura 2: (A) Indivíduos regenerantes de *E. edulis*; (B) Indivíduos adultos

locos SSR foram utilizados em ensaios multiplex (hexaplex) para diminuir os custos e otimizar o tempo dentro do laboratório. O coquetel (13 μ l) para a realização da reação da polimerase em cadeia (PCR) foi composto por 7,5ng de DNA genômico, 250 μ M de dNTPs, 0,75 μ M de MgCl₂, tampão para PCR 1X (10mM de Tris-HCl, 50mM de KCl, 1,5mM de MgCl₂, pH 8.3), 2,5 μ g/ μ l de BSA, 0,2 μ M de cada "primer", um deles marcado com fluorocromo específico, e 1U de *Taq* DNA polimerase (Gibco). As amplificações foram realizadas em termociclador do tipo MJ Research PTC-100 através do seguinte protocolo: 96°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento específica de cada par de "primers" por 1 minuto (Gaiotto et al. 2001), 72°C por 1 minuto e terminando com 72°C por 7 minutos. Os tamanhos dos alelos foram determinados através de um seqüenciador automático de DNA (ABI 377-XL), com o auxílio dos programas Gene Scan e Genotyper (ABI) e do padrão de DNA de tamanho conhecido Rox-500 (ABI).

5.2.2. Análise Estatística

A diversidade genética e as estatísticas *F* foram estimadas sob modelo aleatório de acordo com Weir (1996), em que as populações amostradas são consideradas como representativas da espécie e com uma história evolutiva comum. As frequências alélicas, o número de alelos por loco (*A*), a heterozigosidade observada (*H_o*), a diversidade alélica (*H_e*) e as estatísticas *F* de Wright (*F_{IS}*, *F_{ST}* e *F_{IT}*), foram estimadas utilizando o programa GDA (Lewis & Zaykin, 2000).

Em locos microssatélites, o processo mutacional não está de acordo com o que se admite no modelo de *alelos infinitos* com baixas taxas de mutação. Por essa razão, foi utilizada, além da estatística de *F_{ST}*, uma análoga a ela, denominada *R_{ST}* (Slatkin, 1995), desenvolvida especificamente para dados de microssatélite. Parâmetros como *R_{ST}* e o

fluxo gênico aparente (N_m) foram estimados com o auxílio do programa RST Calc (Goodman, 1997).

Quando as populações se encontram sob equilíbrio de Wright, a taxa de cruzamento é função do coeficiente de endogamia ou índice de fixação alélica (F_{IS}). A taxa de fecundação cruzada aparente (t_a) foi obtida utilizando-se os valores de F_{IS} estimados, de acordo com o seguinte estimador:

$$\hat{t}_a = \frac{(1 - \hat{F}_{IS})}{(1 + \hat{F}_{IS})}$$

O sistema reprodutivo foi estimado de acordo com o modelo misto de cruzamento descrito por Ritland & Jain (1981), utilizando o programa MLTR (Ritland 1990). Foram calculadas a taxa de cruzamento multilocos (t_m), a taxa de cruzamento baseada na média de locos individuais (t_s), a diferença entre estas estimativas ($t_m - t_s$), que representa a taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados, a correlação entre as taxas de cruzamento dentro das progênies (r_t) e a correlação entre parentais de indivíduos resultantes de cruzamento dentro das progênies (r_p), que é a probabilidade de um par de indivíduos de uma mesma progênie ser constituído de irmãos germanos. Os desvios-padrão das estimativas foram determinados por 10.000 reamostragens (*bootstraps*) entre indivíduos.

Os testes de paternidade foram realizados através do método de exclusão. A análise de exclusão de paternidade foi realizada através da comparação dos genótipos de todos os indivíduos adultos contra cada um dos regenerantes amostrados. O índice de paternidade (PI) foi estimado para cada loco e o índice de paternidade combinada (CPI) entre os locos em desequilíbrio de ligação (Gaiotto et al., 2001a), foi utilizada para inferir a probabilidade de paternidade (PP). Esse modelo de estimação foi descrito por Weir (1996):

$$PP = \frac{(CPI) \cdot P}{[(CPI) \cdot P + (1 - P)]}$$

Foram utilizadas três diferentes probabilidades *a priori* (P) para as estimativas de PP: i) 0,5, que é a probabilidade *a priori* sugerida na literatura e rotineiramente utilizada em testes de paternidade em humanos, onde cada indivíduo adulto pode ou não ser o progenitor do regenerante em questão (Smouse & Chakraborty 1986; Gjertson & Morris 1995); ii) 0,007, que é a probabilidade de qualquer indivíduo adulto amostrado (111 do PNB + 33 do IBGE) ser o progenitor (1/144) e iii) 0,0001, que é uma probabilidade quase nula de qualquer indivíduo adulto ser o progenitor, ou seja, uma abordagem bastante conservativa. As razões de verossimilhança para os cálculos de paternidade foram obtidas a partir das frequências alélicas estimadas para a base de dados composta pelos 144 indivíduos adultos amostrados, utilizando uma frequência mínima conservativa de alelos de $5/2n$, ou seja, 0,017.

5.3. RESULTADOS

5.3.1 Variação Genética

Para os 18 locos analisados, as populações apresentaram níveis elevados de diversidade gênica (H_e), variando entre 0,730 e 0,793. A heterozigosidade observada (H_o) variou entre 0,621 e 0,788 (Tabela 1). A média de alelos por loco foi também considerada alta. Os valores de F_{IS} estimados, baseados nas frequências gênicas foram, em todos os estágios de desenvolvimento baixos, porém positivos (Tabela 1). Como a estimativa de F_{IS} para plântulas da casa de vegetação referentes ao IBGE foi quase nula (0,007), o valor médio de F_{IS} para ambas as populações, apresentado na Tabela 1, foi menor que o apresentado na Tabela 3, onde as plântulas da casa de vegetação não foram incluídas na análise.

Tabela 1: Estimativas de variabilidade genética em adultos (A), regenerantes da população natural (Rg) e plântulas da casa de vegetação (Pl) em duas populações de *E. edulis*, sendo N: número de indivíduos amostrados; L: número de locos de microssatélites; A: número médio de alelos; H_o : heterozigosidade observada; H_e : heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg; f: índice de fixação; t_a : taxa de cruzamento aparente e t_m : taxa de cruzamento multiloco.

Pop.		N	L	A	H_o	H_e	f ^(a)	t_a	t_m
PNB	Ad	111	18	11,2	0,697	0,745	0,064	0,880	-
	Rg	231	18	11,3	0,662	0,730	0,094	0,830	-
	Pl	144	06	9,5	0,732	0,759	0,036	0,930	0,904
IBGE	Ad	33	18	8,5	0,662	0,744	0,113	0,800	-
	Rg	208	18	11,6	0,621	0,735	0,156	0,730	-
	Pl	156	06	10,5	0,788	0,793	0,007	0,986	0,981
Média				10,8	0,690	0,749	0,081	0,855	0,941

^(a) $f = F_{IS}$

5.3.2. Sistema de Reprodução

Os resultados referentes às taxas de cruzamento (multilocos e aparente) estão apresentados na Tabela 1. A taxa de fecundação cruzada aparente (t_a), calculada através do F_{IS} estimado, permitiu a obtenção de taxas de cruzamento para os diferentes estágios de desenvolvimento da população (adultos, regenerantes e plântulas da casa de vegetação). De modo geral, as estimativas de t_a foram em média ligeiramente inferiores às obtidas para t_m . Deve-se notar, porém, que o sistema misto de reprodução foi avaliado apenas nas progênes de polinização aberta, já que somente esses indivíduos possuíam estrutura de família. As estimativas de t_a nessas

progênes foram congruentes com as de t_m obtidas para ambas as populações. Sob o modelo de reprodução mista (Ritland & Jain, 1981), foi possível, ainda, estimar as taxas de cruzamento baseadas nas médias de locos individuais (t_s), que foram condizentes entre as duas populações (Tabela 2). As diferenças entre t_m e t_s representam a taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados, que auxilia no incremento da endogamia dentro das populações. Estas diferenças foram de $-0,038$ para o PNB e $0,044$ para o IBGE, sugerindo que a ocorrência de endogamia biparental, por exemplo, cruzamento entre indivíduos aparentados, não é um evento comum.

As probabilidades de dois indivíduos escolhidos ao acaso dentro de uma família serem irmãos germanos (r_p) foram de $0,725 (\pm 0,072)$, para a população do IBGE e $0,712 (\pm 0,120)$, para a do PNB. Estes valores apresentaram-se mais elevados que o esperado para populações de polinização livre, indicando que a ocorrência de irmãos germanos em famílias maternas é relativamente comum em *E. edulis*. As correlações entre taxas de cruzamento dentro de famílias (r_t) foram de $0,542 (\pm 0,062)$ e $0,232 (\pm 0,037)$ para as populações do IBGE e do PNB, respectivamente (Tabela 2). O fato dos valores de r_t não estarem próximos de zero é um indicativo da ocorrência de autofecundação em algumas das famílias estudadas (Ritland 1989).

Tabela 2: Estimativas de parâmetros de sistema reprodutivo, sendo t_m : taxa de cruzamento multiloco; t_s : taxa de cruzamento baseada na média de locos individuais; r_p : correlação de paternidade dentro de progênies resultantes de cruzamento e r_t : correlação entre taxas de cruzamento dentro de famílias.

	PNB	IBGE
t_m	0,904 (0,044) ^a	0,981 (0,020)
t_s	0,941 (0,038)	0,937 (0,038)
t_m-t_s	-0,038 (0,031)	0,044 (0,036)
r_p	0,712 (0,120)	0,725 (0,072)
r_t	0,232 (0,037)	0,542 (0,062)

^a Entre parênteses: erros-padrão estimados através de 10.000 "bootstraps"

5.3.3. Estrutura Genética (Estatísticas F e R_{ST}) e Fluxo Gênico

O índice de fixação (F_{IS}) foi estimado com os 18 locos SSR, considerando todos os adultos e regenerantes das duas populações (Tabela 3). Como citado anteriormente, tais valores foram superiores aos da Tabela 1 porque as plântulas da casa de vegetação não foram consideradas nestas análises.

O valor R_{ST} estimado foi de 0,068 e o F_{ST} foi de 0,061. As duas estimativas foram significativamente diferentes de zero (Tabela 3). Esta significância pode ter ocorrido, apesar dos baixos valores observados, devido ao grande número de alelos existentes nos locos microssatélites, o que torna o teste estatístico extremamente sensível. O parâmetro N_m , baseado na estimativa do R_{ST} , foi de 3,374 (Tabela 3), indicando alta taxa de migrantes entre as duas populações. Este é um indício de que as populações ainda não se encontram em processo de diferenciação e que, provavelmente, possam ser tratadas como uma metapopulação.

A análise entre populações, considerando os regenerantes e adultos amostrados, apresentou um valor F_{IT} de 0,171. Todos os valores de F e de R_{ST} foram estatisticamente significativos no intervalo de confiança de 95% de probabilidade (Tabela 3).

Tabela 3: Estatísticas F de Wright, R_{ST} e o número de migrantes por geração (N_m) para duas populações naturais de *E. edulis* (PNB e IBGE), considerando um intervalo de confiança de 95% de probabilidade. Adultos e regenerantes foram considerados nesta análise.

	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	R_{ST}	N_m
Sob todos os locos	0,117	0,171	0,061	0,069	3,37
Superior (IC _{95%})	0,178	0,239	0,088	0,086	3,98
Inferior (IC _{95%})	0,059	0,105	0,037	0,059	2,65

5.3.4. Análise de Paternidade

Para 153 dos 231 indivíduos regenerantes amostrados no PNB, e com base na exclusão de paternidade, foi encontrado pelo menos um provável progenitor (66,23%) e para 54 destes (23,38%), foram identificados dois prováveis progenitores. Da mesma maneira, na população do IBGE, onde foram amostrados 208 indivíduos regenerantes, para 109 foi encontrado pelo menos um provável progenitor (52,40%) e para 29 (13,94%) foram identificados dois prováveis progenitores. Como as populações foram amostradas em uma distância máxima 170 m (IBGE) e 230 m (PNB), e esta é a distância possivelmente coberta pelos prováveis polinizadores de *E. edulis*, segundo Reis et al. (1993), é possível concluir que o fluxo gênico dentro das populações vem ocorrendo de acordo com o esperado pela hipótese

considerada neste trabalho. Entretanto, cinco indivíduos regenerantes amostrados no IBGE apresentaram o menor número de locos excludentes para serem filhos de indivíduos adultos localizados no PNB (Tabela 4). Apenas um dos progenitores foi detectado para esses cinco indivíduos, portanto nada pode ser afirmado com relação ao tipo de fluxo gênico, se foi realizado via pólen ou semente. Variando a probabilidade *a priori* de 0,5 para 0,0001 (altamente conservativo), a probabilidade de paternidade manteve-se superior a 93% para dois dos progenitores de indivíduos do IBGE terem sido provenientes do PNB (Tabela 4).

Tabela 4: Probabilidades de paternidade ou maternidade com as quais indivíduos adultos de *E. edulis* do PNB são considerados progenitores de regenerantes do IBGE distantes 22 km dos mesmos. Estimativas obtidas a partir de diferentes probabilidades *a priori* (P).

Indivíduo	Provável Progenitor	Probabilidade de Paternidade		
		P=0,5	P=0,007	P=0,0001
RI27	P71	0,999496598	0,933317191	0,165671274
RI36	P4	0,998943508	0,869542993	0,086392846
RI121	P13	0,999996758	0,999540327	0,96860221
RI124	P19	0,999992905	0,998994578	0,93375919
RI146	P13	0,998979069	0,873381998	0,089136714
RI169	P92	0,995675556	0,618766861	0,022508372

Foi observado ainda que alguns indivíduos das duas populações de *E. edulis* estudadas apresentaram sucesso reprodutivo muito superior ao de outros indivíduos da mesma população. Foi o caso dos adultos P2 e P6 do PNB, que apresentaram altas probabilidades de serem progenitores (provavelmente a mãe) de 9,52% e 19,05%, respectivamente, dos 231 regenerantes amostrados nesta população. O mesmo ocorreu no IBGE, onde

o indivíduo I11 apresentou alta probabilidade de ser o progenitor de 21,63% dos 208 regenerantes amostrados.

5.4. DISCUSSÃO

Os 18 locos SSR usados nas análises genéticas efetuadas nesse trabalho detectaram níveis elevados de diversidade alélica em ambas as populações de *E. edulis*, confirmando o elevado conteúdo de informação genética esperado para esse tipo de marcador, em estudos de estrutura genética de populações, sistema reprodutivo e paternidade (Gaiotto et al., 2001a). Esta é a primeira vez em que uma bateria tão ampla de marcadores microssatélites é utilizada para estimativas de parâmetros de sistema reprodutivo e detecção de eventos de fluxo gênico de longa distância em uma espécie arbórea tropical. Embora um número crescente de análises de paternidade e fluxo gênico vem sendo reportado, com essa classe de marcadores (Chase et al., 1996ab; Aldrich et al., 1998), apenas recentemente, o conhecimento detalhado do sistema reprodutivo em árvores tropicais foi descrito com ampla bateria de locos SSR, permitindo uma detecção precisa de eventos de cruzamento, mesmo entre parentes próximos (Collevatti et al., 2001).

Estudos avaliando a taxa de endogamia em espécies florestais têm demonstrado que em fases iniciais do desenvolvimento, os valores de F_{IS} apresentam-se positivos e, durante a fase adulta, estes se apresentam extremamente baixos ou negativos. Esses resultados são atribuídos a uma seleção a favor dos indivíduos heterozigóticos (Eguiarte et al. 1992; Gaiotto et al. 1997). Em ambas as populações de *E. edulis* estudadas, o mesmo não ocorreu. Para os três estágios de desenvolvimento (adultos, regenerantes e plântulas), os valores de F_{IS} foram sempre próximos de zero ou positivos, principalmente para a população do IBGE (Tabela 1). Não tendo sido detectada seleção contra indivíduos endogâmicos em nenhuma fase de desenvolvimento das plantas. Esse comportamento pode ser explicado pelos

padrões de reprodução obtidos nesse estudo. As populações de *E. edulis* possuem um comportamento preferencialmente alógamo, uma vez que as taxas de fecundação cruzada foram sempre superiores a 90%, com baixa ocorrência de autofecundação, e nenhuma endogamia biparental detectada.

A congruência entre as taxas aparente e multilocos de cruzamento é um indicativo de que as populações se encontram sob equilíbrio de Wright. Estes resultados estão de acordo com os obtidos com marcadores isoenzimáticos em outras populações de *E. edulis* amostradas na Floresta Tropical Atlântica, no Sul e Sudeste do Brasil (Reis et al, 1997), indicando a manutenção do sistema de reprodução desta espécie em diferentes ecossistemas. Esses resultados, indiretamente, corroboram com a adequação de marcadores microsatélites para estudos de sistemas reprodutivos, quando comparados aos tradicionalmente utilizados.

Valores baixos (0,044) ou negativos (-0,038) das diferenças entre t_m e t_s é um indício de que os cruzamentos ocorridos nestas populações não se deram entre indivíduos aparentados. Entretanto, os elevados valores de r_p , apresentados na Tabela 2 para ambas as populações, indicam que muitos irmãos completos (germanos) devem ter sido amostrados durante a coleta de sementes. Como as sementes coletadas foram resultantes de polinização aberta, era esperado que cada semente tivesse diferentes progenitores e que, portanto, os valores de r_p fossem nulos ou quase nulos. Os elevados valores de r_p poderiam ser explicados por uma das seguintes hipóteses: i) Deposições múltiplas de pólen, por parte do polinizador sendo que todo o pólen depositado é proveniente de uma mesma fonte ou ii) um maior sucesso reprodutivo de alguns indivíduos quando comparados com outros da mesma população (Ritland, 1989). Com base nos resultados dos testes de paternidade realizados nesse estudo, a segunda hipótese torna-se a mais provável, embora a primeira não possa ser totalmente descartada.

Duas medidas de estruturação genética foram aqui consideradas (F_{ST} e R_{ST}). Em função de que as duas estimativas possuem importantes

vantagens e quando comparadas numericamente, acredita-se ser possível detectar se houve problemas de erros durante a genotipagem dos marcadores microssatélites. Enquanto o valor F_{ST} é baseado na probabilidade de identidade por descendência através do modelo de *alelos infinitos* (*infinite allele model*) , o parâmetro R_{ST} considera o modelo de *mutação aos saltos* (*stepwise mutation model*) onde os alelos podem ser idênticos por estado, apenas porque a mutação agiu aumentando ou diminuindo a mobilidade eletroforética de um alelo em uma unidade (Rousset 1996). De acordo com Slatkin (1995), este segundo modelo é mais apropriado para análise de locos com taxas de mutação elevada, como é o caso dos microssatélites. Devido aos diferentes modelos atribuídos a estes parâmetros, seus processos de estimação também diferem. A natureza do processo de estimação do parâmetro R_{ST} permite que alguns erros de genotipagem ocorram e fiquem diluídos na variância da estimativa.

Muitas vezes, devido ao "gaguejamento" (*stutter*) realizado freqüentemente pela DNA polimerase durante a amplificação de um loco microssatélite, uma determinação imprecisa do tamanho do alelo ocorre, mesmo quando seqüenciadores automáticos de DNA são utilizados na genotipagem dos locos (Haberl & Tautz, 1999). O mesmo não ocorre durante a estimação do índice F_{ST} onde um erro de genotipagem é visto como um novo alelo e considerado como tal na estimativa deste parâmetro.

No presente estudo, cuidados adicionais foram tomados no sentido de se evitar esses erros de genotipagem. Amostras controle foram aplicadas em todos os géis, permitindo a comparação entre os tamanhos estimados de alelos em diferentes eletroforeses. Esse procedimento, provavelmente, contribuiu para que as estimativas de R_{ST} e F_{ST} fossem congruentes, sugerindo forte acurácia na genotipagem.

A porcentagem de regenerantes (66,23% para o PNB e 52,40% para o IBGE), cujos progenitores foram identificados com alto grau de confiabilidade é um indicativo do poder dos marcadores SSR para

investigação de paternidade em populações naturais. Assim como em outros estudos deste tipo (Kaufman *et al.* 1998; Schnabel *et al.* 1998), foi observado que alguns indivíduos apresentaram elevado sucesso reprodutivo. É possível que os indivíduos detectados como os de maior sucesso reprodutivo, sejam os progenitores femininos, uma vez que estavam localizados bastante próximos de sua provável progênie.

Em 23,38% (PNB) e em 13,94% (IBGE) dos casos foram encontrados ambos os progenitores (paterno e materno). Nestes casos, geralmente um progenitor estava localizado próximo do regenerante em análise e o outro estava mais distante. Esse fato é um indicativo de que, em geral, o pólen desta espécie provém de longas distâncias, enquanto as sementes freqüentemente germinam próximo ao progenitor feminino.

Quando os vizinhos mais próximos possuem uma tendência de serem mais aparentados que os vizinhos mais distantes, algumas espécies (por exemplo: *Gleditsia triacanthos* L.) realizam seleção contra o pólen de vizinhos próximos reduzindo, desta forma, o número de progênies endogâmicas (Schnabel & Hamrick 1995). Somente dessa maneira os indivíduos distantes e não relacionados teriam maior sucesso reprodutivo através do fluxo de pólen. O sucesso reprodutivo de alguns indivíduos como progenitor feminino pode se dar por diferentes razões: (1) o palmitreiro poderia ter uma idade específica em que a reprodução fosse mais eficaz, produzindo maior quantidade de frutos; (2) muitas plantas podem não ter florescido ou frutificado durante o período imediatamente anterior ao experimento desta pesquisa.

A investigação detalhada de paternidade detectou eventos inesperados de fluxo gênico, de longa distância, em árvores tropicais. Os parâmetros de informação genética, estimados com a bateria de locos SSR utilizados neste estudo, indicam ser este conjunto de marcadores bastante apropriados para estudos de identificação individual. O poder de exclusão de paternidade, que corresponde à probabilidade com a qual esse conjunto de locos é capaz de excluir de ser o progenitor de uma dada plântula, um

indivíduo erroneamente suspeito, foi superior a 99,999% (Gaiotto et al. 2001).

Em um estudo prévio utilizando isoenzimas, Nason et al. (1998) detectaram uma dispersão de pólen de 5,8 a 14,2 km em espécies da família Moraceae no Panamá. No presente estudo, foi determinado um fluxo gênico (via pólen ou semente) de 22 km com base na elevada razão de verossimilhança de paternidade. Como os genótipos materno e paterno eram desconhecidos não foi possível, em princípio, afirmar se a longa distância de fluxo gênico foi devida à dispersão de pólen ou sementes. As plantas adultas do PNB declaradas como as prováveis progenitoras dos regenerantes amostrados no IBGE apresentaram elevadas probabilidades de paternidade ou maternidade mesmo quando a probabilidade *a priori* de paternidade era extremamente conservativa e praticamente nula (Tabela 4).

Embora o provável polinizador da espécie *E. edulis* seja uma pequena vespa denominada *Trigona spinipes*, cujo vôo atinge em média 50 a 100 metros, existe ainda a hipótese de que a dispersão de pólen também ocorra pelo vento (Reis et al. 1993). Além disso, a polinização de *E. edulis* poderia ocorrer também por outro animal com vôo de longa distância. Estudos utilizando análise de exclusão de paternidade têm revelado que indivíduos amostrados fora da população em estudo podem ser progenitores de sementes amostradas dentro das populações estudadas (Devlin & Ellstrand, 1990).

A dispersão de sementes de *E. Edulis* é realizada por pequenos mamíferos, em geral roedores, ou por pássaros, como os tucanos, que se alimentam do fruto destas palmeiras durante o período de escassez de alimento (Terborgh 1986). Não foi possível determinar o segundo progenitor para os dois regenerantes envolvidos no evento de fluxo gênico de longa distância. Embora o movimento de pólen seja possível, é mais razoável acreditar na possibilidade de que o fluxo gênico, de longa distância, tenha ocorrido através de sementes dispersas por pássaros. Apesar do fluxo gênico detectado no presente trabalho parecer um evento raro, acredita-se

que esse tipo de ocorrência seja relativamente comum entre as populações de espécies arbóreas tropicais. Somente agora, com as poderosas ferramentas disponíveis para estudos populacionais, estes eventos poderão ser detectados com maior frequência.

Teorias de genética populacional mostram que mudanças nos índices de diversidade genéticas são função do tamanho efetivo populacional, que por sua vez é determinado pela taxa de migração entre populações e pela variação do sucesso reprodutivo entre machos e fêmeas (Schnabel *et al.* 1998). Nesse trabalho, foi realizada uma análise detalhada de parâmetros genéticos necessários para o entendimento da dinâmica populacional de *E. edulis*. Essa espécie é um importante recurso genético com potencial comercial ainda inexplorado. Através destas informações, será possível estabelecer de maneira mais eficiente coletas de germoplasma e planos de conservação, bem como estratégias para o desenvolvimento, a longo prazo, de populações de melhoramento.

6. ESTIMATIVAS DE PARENTESCO E DE PARÂMETROS DE HERANÇA QUANTITATIVA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Euterpe edulis* MART. UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES

Estimation of relatedness and quantitative inheritance in natural populations of *Euterpe edulis* Mart. with microsatellite markers

F.A. Gaiotto[†]; A.S.G. Coelho[§]; R. Vencovsky[†]; D. Grattapaglia[#]

[†] Departamento de Genética. ESALQ/USP – Av. Pádua Dias, 11 C.P.83 Piracicaba–SP 13400-970. Brazil.

[§] Departamento de Biologia Geral, ICB/UFG. Campus II C.P. 131 – Goiânia-GO 74001-970. Brazil.

[#] Universidade Católica de Brasília – SGAN 916 Módulo B Brasília - D.F. Brazil

Palavras-chave: parentesco, herdabilidade, populações naturais, SSR, pré-melhoramento, palmito

RESUMO

Estimativas de coeficientes de parentesco entre indivíduos e de parâmetros de herança quantitativa (coeficientes de herdabilidade e correlações genéticas) de caracteres não destrutivos de plântulas foram obtidas para duas populações de *Euterpe edulis* Mart. Tais estimativas foram realizadas pelo modo convencional, com base em análise de variância (ANAVA), e através de uma nova abordagem, utilizando marcadores genéticos.

Os coeficientes de parentesco entre pares de indivíduos dentro de progênes maternas foram, em média, condizentes com o esperado sob o modelo de meios-irmãos ($r=0,125$). As estimativas de coeficientes de herdabilidade e correlações genéticas foram obtidas para os caracteres: altura, diâmetro do coleto, número de folíolos da primeira folha completa e número de folhas. Esses caracteres foram avaliados em plântulas com um ano de idade, em casa de vegetação e em populações naturais. Em geral, para os caracteres avaliados na casa de vegetação, os resultados dos coeficientes de herdabilidade pelo método de marcadores moleculares foram inferiores aos obtidos sob as mesmas condições através de ANAVA. Isto provavelmente ocorreu devido à existência de pares de indivíduos dentro das progênes com parentescos superiores aos esperados sob modelo de meios-irmãos, aumentando a acuidade nas estimativas obtidas pelo método de marcadores genéticos, que calcula os coeficientes de herdabilidade com base no parentesco real existente entre pares de indivíduos. Os resultados obtidos para os coeficientes de correlação genética aditiva entre os caracteres foram congruentes entre o método tradicional e o de marcadores moleculares, tanto para as progênes da casa de vegetação quanto para as plântulas regenerantes amostradas em populações naturais. Este trabalho mostrou a exeqüibilidade do método de análise de herança quantitativa através de marcadores genéticos em populações naturais, e a possibilidade de se gerar subsídios para o pré-melhoramento com esta metodologia.

6.1. INTRODUÇÃO

A relação entre indivíduos aparentados é quantificada utilizando-se alelos idênticos por descendência como elo entre eles, ou seja, dois indivíduos só podem ser aparentados se ambos possuírem cópias exatas de pelo menos parte dos seus genes, provenientes de pelo menos um ancestral comum (Souza Jr., 1989). Diferentes autores publicaram maneiras de calcular medidas de parentescos entre pares de indivíduos; dentre eles, destacam-se: i) Wright (1922) foi o primeiro a estimar o coeficiente de parentesco através da correlação de frequências alélicas entre os gametas de dois indivíduos; ii) Malécot (1948) definiu parentesco como a probabilidade de um gene tomado ao acaso em um indivíduo X ser idêntico, por descendência, a um outro gene tomado aleatoriamente em um indivíduo Y. Este coeficiente equivale numericamente à metade do coeficiente de parentesco de Wright sob sistema reprodutivo aleatório; iii) Kempthorne (1957) publicou um coeficiente de parentesco definido pela probabilidade de dois alelos de X serem idênticos, por descendência, aos dois alelos de Y e, simultaneamente, os dois alelos de X e de Y serem distintos.

O coeficiente de parentesco entre dois indivíduos é facilmente estimado quando a genealogia entre eles é conhecida. Contudo, quando esta é desconhecida, a única maneira de se estimar o coeficiente de parentesco é através de marcadores moleculares (Lynch & Ritland, 1999; Ritland, 1989; Ritland, 2000). Os marcadores moleculares do tipo microssatélite (ou seqüências simples repetidas – SSR) são considerados ideais para este tipo de abordagem (Queller et al., 1993). Por serem estes marcadores, codominantes, multialélicos, amplamente dispersos pelo genoma de eucariotos e facilmente obtidos através de ensaios PCR (reação da polimerase em cadeia) quando as seqüências de DNA que flanqueiam as regiões repetidas são conhecidas.

O conhecimento do parentesco entre indivíduos de populações naturais é considerado um refinamento da análise genética populacional,

uma vez que pode auxiliar sobremaneira estudos de conservação *in situ* e *ex situ*. Na conservação *in situ* com exploração através de manejo sustentável, o avanço com o conhecimento do parentesco entre indivíduos, ocorre no momento da estimativa de áreas de vizinhança entre os indivíduos da população. Nesse caso, torna-se possível conhecer com precisão o fluxo gênico entre e dentro de populações (Miyazaki & Isagi, 2000) e, dessa forma, estabelecer o tamanho da área populacional e o número de indivíduos a ser conservado por área para que a variabilidade genética seja mantida. Já para a conservação *ex situ*, o conhecimento do parentesco entre indivíduos de uma população natural pode auxiliar no estabelecimento de áreas de coleta de propágulos vegetativos ou sementes, de maneira que a amostragem de indivíduos seja realizada entre aqueles menos aparentados. Assim, uma maior variabilidade genética pode ser mantida nas coleções dos bancos de germoplasma.

A combinação entre o melhoramento genético e a conservação *in situ* é outra forma de se conservar as populações naturais remanescentes de espécies vegetais muito exploradas. Realizada pela manutenção das populações na forma como se encontram na floresta, para depois iniciar um plantio comercial da espécie, promovendo incrementos na produção de seus produtos de interesse através do melhoramento genético.

Segundo Lynch & Ritland (1999), o coeficiente de parentesco entre pares de indivíduos desempenha papel importante nas várias áreas da genética e da ecologia comportamental. Em genética quantitativa a semelhança fenotípica entre parentes, base para a estimação dos componentes de variância genética, é função direta da probabilidade de indivíduos possuírem um ou mais genes idênticos por descendência em determinado loco.

Já na década de 60, havia uma preocupação em se estimar parâmetros de herança quantitativa sem a necessidade de se realizar experimentos com progênes. Sakai & Hatakeyama (1963) descreveram uma metodologia para a estimação dos coeficientes de herdabilidade no

sentido amplo, e de correlações genéticas em caracteres quantitativos de espécies florestais sem testes de progênie. Porém algumas condições são necessárias para se obter tais estimativas por esse método: i) todos os indivíduos da floresta devem ter a mesma idade; ii) o espaçamento de plantio deve ser uniforme; iii) a floresta não pode possuir falha natural ou artificial; iv) a floresta não pode sofrer desbastes exagerados.

Espécies florestais geralmente demoram muitos anos para atingir o período reprodutivo, dificultando sobremaneira o desenvolvimento de experimentos com testes de progênie necessários para a obtenção de estimativas de parâmetros de herança quantitativa por métodos tradicionais. O método de Sakai e Hatakeyama (1963) possui a vantagem de gerar estimativas sem a necessidade de testes de progênie. Entretanto, além de ter que atender às condições citadas anteriormente, esse método apresenta a desvantagem de não estimar a herdabilidade no sentido restrito, onde apenas o efeito genético aditivo é considerado sobre a variância fenotípica total.

A herdabilidade expressa a proporção da variância total que é atribuída ao efeito médio de genes. Esta fração determina o grau de semelhança entre parentes (Falconer & Mackay, 1997). A base para a estimativa da herdabilidade (no sentido restrito) de um caráter é a covariância genética entre parentes, pois denota a proporção da variância fenotípica total que é transferida de uma geração para outra. A função mais importante do conhecimento da herdabilidade de um caráter quantitativo é a predição de ganhos em um programa de melhoramento genético após uma ou mais gerações de inter cruzamentos (Falconer & Mackay, 1997). Métodos clássicos de estimar a herdabilidade são baseados na observação da covariância fenotípica existente sob certo grau de parentesco, e na relação dessas estimativas de covariâncias com uma combinação linear de componentes genéticos esperados sob um modelo particular.

Com o conhecimento do parentesco em populações naturais, a estimativa de parâmetros importantes ao melhoramento genético, como a

herdabilidade no sentido restrito e correlações genéticas entre caracteres de interesse, se torna viável (Lynch & Ritland, 1999; Ritland, 1989; Ritland, 1996a).

O grande avanço proporcionado pelos marcadores moleculares neste contexto, foi a possibilidade de se estimar o parentesco entre indivíduos, sem a necessidade de experimentos com progênes para que um modelo particular possa ser estabelecido durante as estimativas (Ritland, 1996b).

Diferentes métodos podem ser utilizados para a obtenção de estimativas de coeficientes de parentesco com o auxílio de marcadores moleculares. Dentre eles destacam-se:

a) O método de Ritland (1996b), que preconiza que, entre um par de indivíduos x e y , cada alelo i em um dado loco l contribui com uma estimativa de parentesco r_{il} . A estimativa do coeficiente de parentesco entre x e y é obtida através das médias de todos os coeficientes obtidos para os n_l alelos dos L locos, usando pesos w_{il} e w_l para alelos e locos, respectivamente. A expressão para a estimativa deste parentesco é dada por:

$$\hat{r}_{xy(rit)} = \sum_l w_l \sum_i w_{il} \hat{r}_{xy(rit)il}$$

Onde:

$$r_{xy(rit)il} = \frac{S_{xy} - p_{il}^2}{p_{il}(1 - p_{il})}$$

S_{xy} é a proporção observada um alelo em X idêntico a um alelo do mesmo loco em Y;

p_{il} é a frequência do alelo i na população

Os pesos correspondentes a locos (w_l) e a alelos (w_{il}) são dados por:

$$w_l = \frac{n_l - 1}{\sum_l (n_l - 1)} \quad w_{il} = \frac{1 - p_{il}}{(n_l - 1)}$$

Onde:

n_l corresponde ao número de alelos do loco l

b) O método da Informação (Coelho, 2000)³, que define os pesos para as estimativas dos parentescos médios com base na contribuição de cada alelo para o conteúdo de informação total (*sensu* Shannon) e possui características semelhantes ao método de Ritland (1996b). A expressão do estimador de parentesco por este método é dada por:

$$\hat{r}_{xy(\text{inf})} = \sum_l w_l \sum_i w_{il} \hat{r}_{xy(\text{inf})il}$$

onde:

$$w_l = \frac{-\sum_i \hat{p}_{il} \log \hat{p}_{il}}{-\sum_{i,l} \hat{p}_{il} \log \hat{p}_{il}} \quad w_{il} = \frac{-\hat{p}_{il} \log \hat{p}_{il}}{-\sum_i \hat{p}_{il} \log \hat{p}_{il}}$$

c) O método de Lynch & Ritland (1999), que é baseado na utilização de um indivíduo do par (com alelos a e b) como referência, e na tomada do outro (com alelos c e d) para se estimar o parentesco entre eles. Este procedimento é realizado nas duas direções e o coeficiente de parentesco entre x e y é obtido a partir da média entre os parentescos de x contra y e de y contra x . Este método foi utilizado nesse trabalho e se encontra descrito na metodologia.

Os coeficientes de parentesco estimados pelos métodos de Ritland (1996b) e Informação (Coelho, 2000)³ referem-se ao parentesco de Malecôt. Este coeficiente de parentesco equivale numericamente à metade do parentesco de Wright, em que é baseado o método de Lynch & Ritland (1999).

O uso de marcadores genéticos no estudo de caracteres quantitativos em populações naturais é uma área quase inexplorada. Análises de

³ COELHO, A.S.G. Comunicação pessoal, 2000.

caracteres quantitativos baseadas em informações obtidas com marcadores genéticos têm sido amplamente realizadas em humanos, animais e plantas domesticadas (Lander & Schork, 1994; Mousseau et al., 1998). Menos atenção tem sido dada a inferências de parâmetros quantitativos com o auxílio de marcadores moleculares em espécies não domesticadas, particularmente àquelas em seus habitats naturais (Ritland & Ritland, 1996).

O palmito é o principal produto de interesse comercial produzido pela espécie *Euterpe edulis* Mart. Sua principal forma de exploração é realizada através do extrativismo em áreas onde a espécie ocorre em grande abundância, geralmente na Floresta Tropical Atlântica. Esta palmeira leva de 8 a 10 anos para atingir o tamanho ideal para a comercialização do palmito, DAP > 8cm (Galetti & Fernandez, 1998).

O palmito em conserva já possuía um mercado interno garantido quando passou a ser exportado para países como França, Estados Unidos, Bélgica, Alemanha, Argentina, Espanha, Canadá, México, entre outros, a partir da década de 60. Houve, então, um incremento nas exportações deste produto ao longo dos anos, bem como o aumento do valor do produto no mercado internacional (Guerra et al. 1984; Mattos & Mattos; 1976). Por este motivo, muitas populações de *E. edulis* existentes na Floresta Atlântica foram extintas devido à exploração desenfreada desta espécie em algumas regiões, já que para a colheita do palmito, é necessária a morte da planta.

Geralmente cada hectare de Floresta Atlântica chega a ter de 500 a 650 plantas de *E. edulis* em fase de colheita, sendo que cada planta produz em média 300 a 400g de palmito (creme). Portanto, em um hectare, é possível colher cerca de 150 a 260 kg de palmito pronto para a comercialização (Orlande et al., 1996). Apesar da alta capacidade de produção, a demanda ainda é muito superior, e as populações naturais continuam a diminuir. Isso ocorre, pois não existe um programa de manejo sustentado para as populações remanescentes de *E. edulis* em áreas particulares. Nestes locais, o palmito pode ser colhido de maneira predatória, e em muitos casos, com a autorização do IBAMA. A colheita do

palmito é proibida somente dentro dos Parques Nacionais e em áreas de preservação ambiental. Uma alternativa para suprir a demanda do produto no mercado nacional e internacional seria através do plantio comercial e do incremento da produtividade através de programas de melhoramento genético.

Até o momento não existem relatos na literatura sobre populações de *E. edulis* submetidas ao melhoramento genético. Como essa espécie demora cerca de seis a oito anos para atingir seu período reprodutivo (Guerra et al., 1984; Mattos & Mattos, 1976), o avanço de gerações de melhoramento clássico para a espécie seria efetuada lenta e gradativamente, da mesma forma que para a maioria das espécies arbóreas. O melhoramento poderia ser acelerado a partir da obtenção de estimativas de parâmetros importantes para sua execução já nas populações naturais, onde a coleta de sementes de indivíduos pré-selecionados seria efetuada para a formação de uma população base de melhoramento. Com esta estratégia, seria realizado um processo de pré-melhoramento nas populações ainda em seus habitats naturais.

O pré-melhoramento é a alternativa mais promissora para servir de elo entre os recursos genéticos e os programas de melhoramento genético, o pré-melhoramento podendo ser conceituado como o conjunto de atividades que visam a identificação de caracteres de interesse presentes em materiais não cultivados (Nass, 1998).⁴

Assim, é fundamental o estabelecimento de relações funcionais entre características fenotípicas não-destrutivas do palmitreiro com seu rendimento industrial. Tais conhecimentos são muito importantes para definir, no campo, o ponto de corte das plantas de maneira simples e com alta correlação com a produtividade (Reis et al., 1999). Portanto, o conhecimento da herança quantitativa de caracteres não-destrutivos altamente correlacionados com a produção de palmito daria início a um processo de pré-melhoramento para a espécie.

⁴ NASS, L.L. Comunicação pessoal, 1998.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de obter estimativas de parentesco em populações naturais de *E. edulis* com o auxílio de marcadores genéticos, dando um passo além dos trabalhos de genética de populações naturais, que visam a conservação de espécies arbóreas tropicais. Além disso, objetivou-se estimar os coeficientes de herdabilidade e de correlações genéticas entre caracteres não-destrutivos correlacionados com a produção de palmito, em populações naturais visando fornecer subsídios para programas de pré-melhoramento.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1. Material Vegetal

Foram coletadas folhas frescas para a extração de DNA de indivíduos adultos e regenerantes de duas populações naturais de *E. edulis* em áreas de preservação próximas à cidade de Brasília. Tratam-se de populações de matas de galeria localizadas no Parque Nacional de Brasília (PNB) (15°45'48"S, 47°58'80"W), e na Reserva Ecológica do Roncador, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (15°56'26"S, 47°53'37"W).

Os adultos amostrados totalizaram 144, dos quais 111 foram coletados no PNB e 33, no IBGE. Os 439 indivíduos regenerantes coletados possuíam no máximo um ano de idade. Deste total, 231 foram amostrados no PNB e 208, no IBGE. O controle de idade dos regenerantes foi realizado através da marcação com fitas coloridas de todos os indivíduos de até 50 cm de altura existentes na área de estudo um ano antes da coleta. Essa marcação foi realizada no início da época de frutificação de *E. edulis* nas regiões das Matas de Galeria estudadas. Dessa forma, após um ano, todos os indivíduos com menos de 50 cm que não possuíam a fita colorida foram amostrados, possuindo, portanto, aproximadamente um ano de idade.

Sementes de adultos das duas populações foram coletadas e germinaram em casa de vegetação. As plântulas cresceram até um ano de idade, quando as medidas dos caracteres quantitativos de interesse foram tomadas, e folhas frescas de uma amostra deste material foram coletadas para a extração de DNA.

6.2.2. Condições de amplificação dos locos SSR

Os indivíduos adultos e regenerantes amostrados nas populações naturais de *E. edulis* foram genotipados com 18 locos SSR fluorescentes. As plântulas da casa de vegetação foram genotipadas com seis destes 18 locos.

As condições de amplificação dos locos microsatélites para *E. edulis* foram descritas previamente (Gaiotto et al., 2001a). O coquetel para o PCR foi composto por 7,5 ng de DNA genômico, 250 μ M de dNTP, 0,75 μ M de $MgCl_2$, tampão para PCR 1X (10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1,5 mM de $MgCl_2$, pH 8,3), 2,5 μ g/ μ l de BSA, 0,2 μ M de cada "primer", sendo um deles marcado com fluorescência (azul, verde ou amarela) e 1U de *Taq* DNA polimerase (Gibco). As amplificações foram realizadas utilizando-se termociclador do tipo MJ Research PTC-100 programado para o seguinte protocolo: 96°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento específica para cada par de "primers" (T_a °C) (Gaiotto et al. 2001a) por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, terminando com 7 minutos a 72°C. As corridas eletroforéticas foram realizadas em seqüenciador automático de DNA (ABI 377 / Perkin Elmer, CA), com gel de alta resolução de poliacrilamida em sistemas multiplex de seis em seis locos.

Os tamanhos dos alelos foram determinados graças ao padrão de DNA de tamanho conhecido (Rox-500/ABI), com o auxílio dos programas GeneScan (ABI) e Genotyper (ABI).

6.2.3. Delineamento Experimental

Nas duas populações estudadas (PNB e IBGE), todos os indivíduos de *E. edulis* (adultos e regenerantes) existentes ao redor de transectos pré-estabelecidos foram amostrados. Os transectos possuíam respectivamente 227,4m e 166m. A localização relativa dos adultos amostrados nas duas populações pode ser observada na Figura 1.

6.2.3.1. Experimento em campo utilizando plântulas de *E. edulis*

Foram tomadas as seguintes medidas de caracteres quantitativos não destrutivos de plântulas em campo: (1) número de folíolos da primeira folha completa; (2) diâmetro à altura do coleto (região do caule que dará origem ao palmito nas plantas adultas); (3) número de folhas e (4) altura. Os três primeiros caracteres estão altamente correlacionados com a produção de palmito na planta adulta. Segundo Campos et al. (1991), quanto maior o número de folíolos na primeira folha completa, maior o peso do palmito após o corte da planta adulta. Os outros dois caracteres (diâmetro do coleto e número de folhas) possuem, respectivamente, as correlações $r^2=0,935$ e $r^2=0,73$ com a produção em peso de palmito na planta adulta (Bovi & Godoy Jr., 1991; Fantini et al., 1997).

6.2.3.2. Experimento em condições controladas com plântulas de *E. edulis*

Os experimentos em condições controladas foram conduzidos em casa de vegetação. Sementes germinadas a partir de frutos coletados de plantas adultas localizadas em cada uma das populações naturais constituíram a população experimental da casa de vegetação. Foram estabelecidas 18 e 15 famílias oriundas de plantas maternas do PNB e do IBGE, respectivamente, com até 20 indivíduos por família. O experimento foi conduzido em três blocos casualizados com observações individuais dentro de parcelas (Figura 2).

Figura 1: Localização relativa dos indivíduos adultos de *E. edulis* amostrados (pontos pretos) no PNB (A) e no IBGE (B). Os pontos em cinza representam as estacas que delimitam o transecto amostral.

Estas progênies foram utilizadas para estimar os parâmetros de genética quantitativa através dos métodos tradicionais de análise de variância. Os mesmos caracteres quantitativos avaliados em campo (diâmetro do coleto; número de folhas, altura e número de folíolos da primeira folha completa) também foram mensurados nas populações sob condições controladas, para que as comparações no final do processo fossem estabelecidas.

Uma amostra da população sob condições controladas (12 famílias oriundas de adultos do PNB e 13 famílias oriundas de adultos IBGE, contendo 12 indivíduos cada) foi genotipada com seis locos microssatélites. A maior parte das plântulas genotipadas foram amostradas em um único bloco (bloco 1). Apenas quando os indivíduos presentes no bloco 1 eram insuficientes para completar o número desejado de indivíduos por família, foram coletados indivíduos em outros blocos. Assim, apenas uma pequena parcela das plântulas (provenientes da casa de vegetação) genotipadas pertenciam a outro bloco diferente do bloco 1.

A genotipagem dessa amostra das plântulas da casa de vegetação foi realizada por dois motivos: (1) para se estabelecer comparações entre os coeficientes de parentesco obtidos através de marcadores moleculares e o parentesco admitido para famílias maternas, que é 0,125 ($1/8$); (2) para a realização de comparações entre as estimativas dos parâmetros de herança quantitativa obtidos através do método de marcadores, com as obtidas pelo método tradicional de análise de variância, utilizando indivíduos provenientes do mesmo ambiente.

Figura 2: Experimento com três blocos casualizados de progênies maternas (provenientes do PNB e do IBGE) de *E. edulis* sob condições controladas.

6.2.4. Estimação dos coeficientes de parentesco via marcadores microssatélites

Para a estimativa de coeficientes de parentesco entre pares de indivíduos, foi utilizado o método descrito por Lynch & Ritland (1999) que é baseado na utilização de um indivíduo do par (com alelos a e b) como referência e na tomada do outro (com alelos c e d) para se estimar o parentesco entre eles. Este procedimento é realizado nas duas direções, e o coeficiente de parentesco entre x e y é obtido a partir da média entre os parentescos de x contra y e de y contra x . A expressão geral deste estimador é:

$$\hat{r}_{xy(lyn)} = \frac{p_a(S_{bc} + S_{bd}) + p_b(S_{ac} + S_{ad}) - 4p_ap_b}{(1 + S_{ab})(p_a + p_b) - 4p_ap_b}$$

onde:

p_a , p_b , p_c e p_d correspondem às frequências alélicas populacionais dos alelos a , b , c e d , respectivamente;

$S_{ab} = 1$ se o indivíduo referência for homozigótico e $S_{ab} = 0$, se for heterozigótico;

$S_{ac} = 1$ se o alelo a do indivíduo referência for igual ao alelo c do indivíduo "em prova" e $S_{ac} = 0$, se forem diferentes;

$S_{ad} = 1$ se o alelo a do indivíduo referência for igual ao alelo d do indivíduo "em prova" e $S_{ad} = 0$, se forem diferentes;

$S_{bc} = 1$ se o alelo b do indivíduo referência for igual ao alelo c do indivíduo "em prova" e $S_{bc} = 0$, se forem diferentes;

$S_{bd} = 1$ se o alelo b do indivíduo referência for igual ao alelo d do indivíduo "em prova" e $S_{bd} = 0$, se forem diferentes;

$S_{cd} = 1$ se o indivíduo "em prova" for homozigótico e $S_{cd} = 0$, se for heterozigótico.

Para a estimação de parentesco pelo método de Lynch & Ritland (1999) a partir de dados de múltiplos locos, assume-se que estes locos não são ligados, e que as estimativas para cada loco específico são independentes. O coeficiente de parentesco entre os indivíduos x e y é dado pela expressão:

$$\hat{r}_{xy} = \frac{1}{2} \left[\frac{1}{W_{xy}} \sum_{l=1}^L w_{xy(l)} \hat{r}_{xy(l)} \right]$$

onde:

W_{xy} é a soma dos pesos sobre todos os L locos

$w_{xy(l)}$ é o peso utilizado para o loco l em todas as estimativas de r_{xy} , sendo que a expressão geral deste peso é dada por:

$$w_{xy(l)} = \frac{1}{\text{Var}[\hat{r}_{xy(l)}]} = \frac{(1 + S_{ab})(p_a + p_b) - 4p_a p_b}{2p_a p_b}$$

Os coeficientes de parentescos estimados entre pares de indivíduos nesse trabalho referem-se ao parentesco de Malécot (1948). Desta forma, houve a necessidade de multiplicar todos os componentes da expressão do coeficiente de parentesco de Lynch & Ritland (1999) por $\frac{1}{2}$, uma vez que este coeficiente refere-se ao parentesco de Wright (1922).

6.2.5. Estimativa de parâmetros de herança quantitativa baseada em marcadores SSR

Para inferir sobre herança quantitativa *in situ*, foi utilizado o método de RITLAND (1996a). Medidas dos caracteres quantitativos, distância física entre pares de plantas e sua genotipagem através de marcadores microssatélites foram tomadas para este fim. Este método é baseado na definição da similaridade fenotípica Z_i para características quantitativas entre pares de indivíduos, como sendo:

$$Z_i = \frac{(Y_i - U)(Y'_i - U)}{V}$$

onde:

Y_i é o valor do caráter no primeiro indivíduo do par;

Y'_i é o valor do caráter no segundo indivíduo do par;

U e V são, respectivamente, a média e a variância do caráter na população.

Para a estimativa do coeficiente de herdabilidade em populações naturais com o auxílio de marcadores moleculares, foi aplicado o modelo de Ritland (1996a), utilizando-se o parentesco descrito pelo modelo de Lynch & Ritland (1999). A expressão deste estimador é dada por dois modelos (1 e 2). No modelo 1, os efeitos ambientais compartilhados entre um par de indivíduos não são considerados na estimação dos parâmetros. Já no modelo 2, os efeitos do ambiente compartilhado pelo par são levados em conta.

MODELO 1: Com a variância genética puramente aditiva e nenhum efeito ambiental compartilhado, a similaridade fenotípica (Z_i) entre dois indivíduos X e Y para um caráter quantitativo é:

$$Z_i = 2r_i h^2 + e_i$$

onde:

h^2 é a herdabilidade no sentido restrito;

r_i é o coeficiente de parentesco entre os indivíduos X e Y;

e_i é o efeito residual aleatório associado à similaridade fenotípica entre os indivíduos X e Y, com esperança igual a 0.

A herdabilidade no sentido restrito, neste caso, é estimada por:

$$\hat{h}^2 = \frac{C_{Zr}}{2V_r}$$

Onde:

C_{Zr} é a covariância entre a similaridade fenotípica (Z_i) e o parentesco estimado (r_{xy});

V_r é a variância real do parentesco entre todos os pares de indivíduos, dada por:

$$\hat{V}_r = \left(\frac{1}{N} \right) \sum_{i=1}^N \left[\frac{\left(\sum_i w_{il} r_i \right)^2 - \sum_i w_{il}^2 \hat{r}_i^2}{1 - \sum_i w_{il}^2} \right] - R^2$$

Onde:

R é o parentesco médio populacional

N é o número de pares de indivíduos

MODELO 2: Com efeito ambiental compartilhado entre dois indivíduos X e Y, o modelo linear para a similaridade fenotípica é dado por:

$$Z_i = 2r_i h^2 + a_e + b_e d_i + e_i$$

Onde:

a_e é a correlação ambiental entre indivíduos compartilhando o mesmo meio ambiente;

b_e é a variação na correlação ambiental entre indivíduos em decorrência da variação na distância entre eles;

d_i é a distância física entre os indivíduos X e Y.

Neste caso, as estimativas de herdabilidade e dos parâmetros ambientais são dadas por:

$$\hat{h}^2 = \frac{C_{rz} V_d - C_{az} C_{rd}}{2(V_d V_r - C_{rd}^2)}$$

$$\hat{b}_e = \frac{C_{az} V_r - C_{rz} C_{rd}}{V_d V_r - C_{rd}^2}$$

$$\hat{a}_e = \bar{Z} - \hat{b}_e \bar{d} - 2\hat{h}^2 \bar{r}$$

onde:

V_d corresponde à variância da distância física entre todos os pares de indivíduos;

V_r corresponde à variância do parentesco entre todos os pares de indivíduos;

C_{rd} corresponde à covariância entre as estimativas do coeficiente de parentesco e a distância física entre todos os pares de indivíduos;

C_{rz} corresponde à covariância entre as estimativas do coeficiente de parentesco e a similaridade fenotípica do caráter quantitativo entre todos os pares indivíduos;

C_{dz} corresponde à covariância entre a distância física e a similaridade fenotípica do caráter quantitativo entre todos os pares de indivíduos.

Para a obtenção das estimativas das correlações genéticas aditivas (r_g) entre os caracteres avaliados para plântulas da casa de vegetação e regenerantes amostradas no campo, foi utilizado o seguinte estimador (Ritland, 1996a), modificado por Coelho (2001):⁵

$$r_{g(A,B)} = \frac{h_{AB}^2}{\sqrt{h_A^2 h_B^2}}$$

Onde:

h_A^2 é o coeficiente de herdabilidade do caráter A;

h_B^2 é o coeficiente de herdabilidade do caráter B;

h_{AB}^2 é um coeficiente análogo ao coeficiente de herdabilidade obtido utilizando o coeficiente de similaridade fenotípica Z_{ABi} dado por:

⁵ COELHO, A.S.G. Comunicação pessoal, 2001.

$$Z_{ABi} = \frac{\frac{1}{2}[(Y_A - U_A)(Y_B^i - U_B) + (Y_B - U_B)(Y_A^i - U_A)]}{\sqrt{V_A V_B}}$$

Tanto para estimativas de parentesco quanto para as de coeficientes de herdabilidades e de correlações genéticas foi utilizado o programa computacional SANCHO (Sistema de ANálise para Cálculo de Herdabilidade e Outros parâmetros - Coelho, 2001).

Com base nos resultados obtidos para o sistema de cruzamento (Gaiotto et al., 2001b), as populações em estudo foram consideradas panmíticas, sendo que o efeito da endogamia na manifestação dos caracteres avaliados, foi considerado desprezível.

As estimativas dos coeficientes de herdabilidade obtidos através de marcadores SSR para os caracteres mensurados no experimento sob condições controladas foram calculadas apenas com base no modelo 1, onde os efeitos ambientais compartilhados entre pares de indivíduos não são considerados. Esse modelo foi selecionado pois o efeito da variação entre blocos foi considerado pequeno e porque a maioria das progênes genotipadas foi amostrada em um único bloco.

Os desvios padrão foram estimados pelo método de reamostragem ("bootstrap"), onde pares de indivíduos foram a unidade de reamostragem, baseando-se sempre em 10.000 "bootstraps". Os intervalos de confiança foram estimados para o nível de 95% de probabilidade.

6.2.6. Estimativa de parâmetros de herança quantitativa em condições controladas

Para as estimativas de herdabilidades e correlações genéticas pelo método tradicional, foi utilizado o experimento das progênes de irmãos maternos da casa de vegetação.

Com base nos resultados da análise de variância (ANAVA), foram obtidas estimativas para os componentes de variância genética e ambiental utilizados nas estimativas dos coeficientes de herdabilidade, conforme metodologia descrita por Vencovsky & Barriga (1992). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com observações de plantas individuais dentro de parcelas.

O intervalo de confiança a 95% de probabilidade foi estimado com base nos erros-padrão obtidos, admitindo-se normalidade.

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1. Parentesco

Uma grande inovação nos estudos genéticos de populações naturais de espécies arbóreas tropicais foi apresentada nesse trabalho, através da estimação de parâmetros de herança quantitativa, pelo conhecimento do parentesco entre pares de indivíduos, obtido por marcadores microsatélites.

O método de Lynch & Ritland (1999) foi utilizado por ser considerado o mais adequado para estimar coeficientes de parentesco com os dados de microsatélites em populações naturais como as de *E. edulis*. Isso porque as populações utilizadas neste trabalho foram consideradas não-endogâmicas e, segundo os próprios autores, este método supera o de Ritland (1996b) nesse caso. Além disso, segundo Ritland (2000), o método desenvolvido por Lynch & Ritland (1999) é mais eficiente estatisticamente que o método de Ritland (1996a). O método da informação apresenta vantagens sobre os demais quando existem muitos eventos de autofecundação nas populações em estudo (Coelho, 2000)⁶. Comparando-se os três métodos, o único que apresenta sempre o valor real do coeficiente de parentesco de um indivíduo comparado com ele mesmo ($r=0,5$) é o de Lynch & Ritland (1999).

⁶ COELHO, A.S.G. Comunicação pessoal, 2000.

As estimativas de parentesco (r) entre indivíduos dentro de famílias de irmãos maternos foram, em média, congruentes com o esperado ($r=0,125$) para as duas populações estudadas (Figura 3). Na população do PNB (Figura 3A), apesar da maioria dos parentescos estar em torno de 0,125, é possível notar ainda classes variáveis de parentescos com valores abaixo de 0,125, 0,25 e, aproximadamente, 0,5. Isso é um indicativo da provável existência de indivíduos com parentescos variando de: inferior à meios-irmãos, irmãos germanos e resultantes de autofecundação, dentro das famílias. Para as progênes provenientes do IBGE, comportamento semelhante foi identificado. Entretanto, nessa população, as famílias se aproximam mais de famílias perfeitas de meios-irmãos (Figura 3B).

Dois fatores estariam contribuindo para essa continuidade de classes de parentescos na curva de “ r ” dentro de famílias maternas: i) o erro das estimativas dos coeficientes de parentesco obtido pelo método de marcadores genéticos. Em muitos casos, o coeficiente de parentesco entre indivíduos pertencentes à mesma família foi zero ou negativo, o que seria impossível se os coeficientes de parentescos pudessem ser estimados precisamente; ii) em populações naturais, principalmente de espécies arbóreas, existem, teoricamente, infinitos valores de “ r ” dentro de famílias, uma vez que os cruzamentos ocorrem por polinização aberta e que, nessas populações, é comum a sobreposição de gerações. Dessa forma, podem ocorrer cruzamentos entre indivíduos aparentados (entre primos, entre tios e sobrinhos, entre netos e avós e assim sucessivamente), produzindo progênes com coeficientes contínuos de parentesco, superiores a 0,125. Se um indivíduo encontra-se isolado dos demais, por exemplo, possui maior probabilidade de autofecundar e gerar progênes com parentescos próximos a 0,5. Ou, por outro lado, ocorrer cruzamentos entre indivíduos com grau de divergência superior à média populacional, produzindo plantas filhas cujo coeficiente de parentesco é inferior a 0,125. Por exemplo, a partir do cruzamento de uma planta (X) com outra (Y), cuja divergência genética em

relação a X é superior a qualquer outra escolhida aleatoriamente na população.

Figura 3: Parentescos, estimados através de marcadores SSR, entre pares de indivíduos dentro de progênies maternas provenientes do PNB (em A) e do IBGE (em B), desenvolvidas sob condições controladas.

Se essa última fosse uma tendência dentro das populações, poder-se-ia suspeitar da ocorrência de cruzamentos preferenciais entre indivíduos distintos (*disassortative mating*). Como consequência desse tipo de cruzamento, além da diminuição do parentesco entre indivíduos dentro de famílias, ocorreria uma elevação da heretozigosidade observada em detrimento do número de indivíduos homozigóticos existentes na população. Caso contrário, se houvesse uma tendência na obtenção de parentescos superiores a 0,125, cruzamentos preferenciais entre indivíduos similares poderia estar ocorrendo (*assortative mating*). A consequência, então, seria um aumento no número de indivíduos homozigóticos, ampliando a possibilidade de endogamia intrapopulacional (Falconer & Mackay, 1997).

Observando-se as médias de parentesco dentro de famílias, porém, é possível concluir que não existem cruzamentos preferenciais (entre indivíduos divergentes ou similares) nas populações de *E. edulis* estudadas (Figura 3).

Quando famílias individuais foram analisadas, observou-se que os valores dos coeficientes de parentesco existentes entre indivíduos dentro de cada família eram bastante variáveis. Exemplos deste tipo de variação dentro de famílias do PNB podem ser visualizados na Figura 4. Nota-se que nessas quatro famílias escolhidas aleatoriamente entre as 12 genotipadas provenientes do PNB, os coeficientes de parentesco variaram de 0,084 a 0,208. Esse é um indicativo do erro cometido pelo melhorista ao considerar que todas as famílias de irmãos-maternos provenientes de populações naturais possuem coeficientes de parentesco de $\frac{1}{8}$ ($r=0,125$) entre indivíduos dentro de famílias.

Gaiotto et al. (2001b) encontraram elevadas probabilidades de dois indivíduos escolhidos ao acaso dentro de progênes serem irmãos germanos (r_p) tanto para a população do IBGE quanto para a do PNB. Os resultados de parentesco estimados nesse trabalho confirmam aqueles obtidos durante as análises de sistemas de reprodução nessas populações.

Figura 4: Comportamento dos coeficientes de parentescos dentro de quatro famílias individuais escolhidas aleatoriamente entre as progênes maternas do PNB.

Estimativas de parentesco em populações naturais vêm sendo utilizadas para diversas finalidades, principalmente nas áreas de genética quantitativa e populacional (Ritland, 2000). De um modo geral, quando os coeficientes de parentesco foram comparados com a distância física entre pares de indivíduos, foi possível notar uma tendência na diminuição dos coeficientes de parentesco entre indivíduos de populações naturais com o aumento da distância entre eles. Isso ocorreu tanto para indivíduos adultos quanto para regenerantes nas duas populações (Figuras 5 e 6). A dispersão dos pontos nos gráficos aproxima-se de um “modelo de envelope”, em que seria possível traçar uma linha de tendência para os valores superiores e outra para os inferiores. Resultados semelhantes foram encontrados por Ritland & Ritland (1996) e por Lynch & Ritland (1999). Dessa forma, é possível concluir que quanto mais distantes estiverem dois indivíduos,

menor a probabilidade de serem aparentados. Em contrapartida, o fato de dois indivíduos se situarem próximos em um ambiente não exclui a probabilidade de serem não-aparentados.

Figura 5: Relação entre os coeficientes de parentesco e a distância física entre pares de indivíduos adultos do PNB (111 indivíduos) e do IBGE (33 indivíduos).

Figura 6: Relação entre os coeficientes de parentesco e a distância física média entre pares de indivíduos regenerantes do PNB (231 indivíduos) e do IBGE (208 indivíduos).

Observando a Figura 7 (A e B), nota-se uma diminuição nos coeficientes de parentesco médios com o aumento da distância. Tanto as curvas de adultos quanto as de regenerantes apresentaram comportamentos semelhantes para ambas as populações avaliadas. Exceção feita aos resultados de adultos do IBGE, os quais apresentaram-se, em média, negativos. Isso ocorreu, provavelmente, devido ao pequeno número de indivíduos avaliados (33). O recomendado para esse tipo de abordagem é a genotipagem de um grande número de indivíduos por população (Ritland & Ritland, 1996).

Houve uma tendência em se observar parentescos positivos apenas entre indivíduos situados dentro de 15 metros de distância, indicando uma autocorrelação espacial positiva entre esses indivíduos. Esses resultados explicitaram um grande avanço nos estudos de estrutura genética intrapopulacional obtidos com o auxílio de marcadores genéticos. Tais estimativas virão a corroborar para conservação de recursos genéticos *ex situ*. Através de dados de parentesco, portanto, com significado genético, é possível conhecer a amplitude das áreas de vizinhança dentro de populações naturais. A partir daí, existe a possibilidade de se estabelecer estratégias de coleta de sementes em indivíduos de palmitero distantes mais de 25m, por exemplo, aumentando a probabilidade de coletar germoplasma apenas de indivíduos não aparentados.

Figura 7A: Correlograma de coeficientes médios de parentesco estimados entre pares de indivíduos de *E. edulis* situados dentro de 10m de distância (linhas cheias). Percentis de 2,5% e de 97,5 % (linhas pontilhadas).

Figura 7B: Correlograma de coeficientes médios de parentesco estimados entre pares de indivíduos de *E. edulis* situados dentro de 10m de distância (linhas cheias). Percentis de 2,5% e de 97,5 % (linhas pontilhadas).

Estudos semelhantes observando autocorrelação espacial e estrutura genética intrapopulacional foram realizados para outras espécies vegetais (Loiselle et al., 1995; Miyazaki & Isagi, 2000). Tais autores observaram um decréscimo nos níveis de coancestralidade com o aumento da distância entre indivíduos. O coeficiente de coancestralidade mede a correlação entre as freqüências alélicas num dado loco, analisadas em pares de indivíduos de uma população. Segundo Loiselle et al. (1995), existe grande vantagem em estudar autocorrelação espacial através de medidas de parentesco quando comparadas às maneiras tradicionais realizadas através de correlação “*I*” de Moran. O estudo da estrutura espacial avaliada sob a óptica do parentesco proporciona um conhecimento de autocorrelação espacial existente nas populações naturais com significado genético.

Existe ainda uma forte relação entre os estudos de estrutura genética intrapopulacional e a dispersão de genes através de pólen ou sementes. Uma abordagem importante para o conhecimento da estrutura genética intrapopulacional através do fluxo de pólen examinado através da estimativa de parentesco entre indivíduos foi apresentada por Miyazaki & Isagi (2000). Assim como no presente trabalho, os autores demonstraram uma tendência na diminuição dos níveis de parentescos entre indivíduos com o aumento da distância física existente entre eles. Esse tipo de estudo em fina escala seria impossível sem o conhecimento dos níveis de parentescos existentes entre pares de indivíduos.

6.3.2. Herdabilidades

As médias e variâncias obtidas para os quatro caracteres de plântulas mensurados nas populações naturais de *E. edulis* estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2. Através de teste t, foi possível notar diferenças significativas entre todos os valores médios dos caracteres nas populações naturais com aqueles obtidos para as progênies de mesma idade (um ano) desenvolvidas em casa de vegetação (Tabela 2). Essas diferenças entre as médias

ocorreram provavelmente devido a divergências ambientais existentes entre o campo e a casa de vegetação (tipo de solo, umidade e luminosidade, principalmente).

Tabela 1. Médias e variâncias estimadas para os caracteres quantitativos mensurados em campo e na casa de vegetação (casa veg.) de plantas jovens das duas populações naturais de *E. edulis* estudadas. Teste t para comparações de médias entre PNB e IBGE.

Local	Caráter	PNB		IBGE		p
		média	variância	média	variância	
Campo	diâmetro (cm)	0,36	0,0091	0,32	0,0061	<0,0001
	altura (cm)	13,57	27,7106	12,44	28,9494	0,0134
	nº de folíolos	6,21	0,3493	6,13	0,2162	0,0513
	nº de folhas	2,03	1,1901	2,05	0,8383	0,4447
Casa Veg.	diâmetro (cm)	0,97	0,0662	0,97	0,0468	0,4708
	altura (cm)	24,61	41,9352	21,47	27,6749	<0,0001
	nº de folíolos	4,16	7,5117	5,67	1,9038	<0,0001
	nº de folhas	5,21	1,4921	5,19	1,0022	0,4282

Entre as populações (PNB e IBGE), o teste t apresentou diferenças significativas apenas entre alguns caracteres (Tabela 1). Para metade dos caracteres, tanto para as plântulas desenvolvidas na casa de vegetação, quanto para aquelas avaliadas no campo, não foram observadas diferenças estatísticas. Isso pode indicar que, provavelmente, exista uma baixa divergência genética entre essas populações. Esses indícios são reforçados quando são observados os baixos valores de F_{ST} e R_{ST} obtidos para essas populações com marcadores microssatélites (Gaiotto et al., 2001b).

Tabela 2. Médias e variâncias estimadas para os caracteres quantitativos mensurados em campo e na casa de vegetação (casa veg.) de plantas jovens das duas populações naturais de *E. edulis* estudadas. Teste t para comparações de médias entre casa de vegetação e campo.

Local	Caráter	Campo		Casa Veg.		p
		média	variância	média	variância	
PNB	diâmetro (cm)	0,36	0,0091	0,97	0,0662	<0,0001
	altura (cm)	13,57	27,7106	24,61	41,9352	<0,0001
	n° de folíolos	6,21	0,3493	4,16	7,5117	<0,0001
	n° de folhas	2,03	1,1901	5,21	1,4921	<0,0001
IBGE	diâmetro (cm)	0,32	0,0061	0,97	0,0468	<0,0001
	altura (cm)	12,44	28,9494	21,47	27,6749	<0,0001
	n° de folíolos	6,13	0,2162	5,67	1,9038	<0,0001
	n° de folhas	2,05	0,8383	5,19	1,0022	<0,0001

As análises de variância (ANAVA) efetuadas para as progênes da casa de vegetação das duas populações de *E. edulis* são apresentadas nas Tabelas 3 a 10.

Tabela 3: ANAVA para o caráter número de folhas nas progênes de irmãos maternos desenvolvidas a partir de sementes provenientes do IBGE.

FV	G.L.	SQ	QM	E (QM)	F	p
Blocos	2	1,9604	0,9802	$\sigma_d^2 + 10,621\sigma_e^2 + 153,52\sigma_b^2$	0,89	0,4240
Progênes	14	79,7737	5,6981	$\sigma_d^2 + 15,007\sigma_e^2 + 44,763\sigma_p^2$	5,15	0,0001
Resíduo (entre)	27	29,8730	1,1064	$\sigma_d^2 + 15,438\sigma_e^2$	1,24	0,1850
Resíduo (dentro)	637	566,4795	0,8893	σ_d^2		
Total	680	678,2379				

Média=5,19 folhas; CV_{dentro}=18,14%; CV_{entre}=20,23%; CV_{genético}=12,33%

Tabela 4: ANAVA para o caráter número de folhas nas progênies de irmãos maternos desenvolvidas a partir de sementes provenientes do PNB.

FV	G.L.	SQ	QM	E (QM)	F	p
Blocos	2	4,0042	2,0021	$\sigma_d^2 + 4,1792\sigma_e^2 + 71,047\sigma_b^2$	1,32	0,2800
Progênies	17	92,7216	5,4542	$\sigma_d^2 + 7,6061\sigma_e^2 + 22,457\sigma_p^2$	3,61	0,0009
Resíduo (entre)	32	48,3607	1,5113	$\sigma_d^2 + 7,9091\sigma_e^2$	1,19	0,2301
Resíduo (dentro)	369	470,5772	1,2753	σ_d^2		
Total	420	631,6057				

Média=5,20 folhas; CV_{dentro}=21,68%; CV_{entre}=23,60%; CV_{genético}=16,11%

Tabela 5: ANAVA para o caráter altura nas progênies de irmãos maternos desenvolvidas a partir de sementes provenientes do IBGE.

FV	G.L.	SQ	QM	E (QM)	F	p
Blocos	2	115,6227	57,8113	$\sigma_d^2 + 10,621\sigma_e^2 + 153,52\sigma_b^2$	3,01	0,0658
Progênies	14	6508,3037	464,8788	$\sigma_d^2 + 15,007\sigma_e^2 + 44,763\sigma_p^2$	24,24	0,0001
Resíduo (entre)	27	517,7560	19,1761	$\sigma_d^2 + 15,438\sigma_e^2$	1,05	0,3956
Resíduo (dentro)	637	11623,7460	18,2476	σ_d^2		
Total	680	18791,7030				

Média=21,46 cm; CV_{dentro}=19,88%; CV_{entre}=20,38%; CV_{genético}=29,37%

Tabela 6: ANAVA para o caráter altura nas progênies de irmãos maternos desenvolvidas a partir de sementes provenientes do PNB.

FV	G.L.	SQ	QM	E (QM)	F	p
Blocos	2	87,2988	43,6494	$\sigma_d^2 + 4,1792\sigma_e^2 + 71,047\sigma_b^2$	1,19	0,3175
Progênies	17	4127,9879	242,8228	$\sigma_d^2 + 7,6061\sigma_e^2 + 22,457\sigma_p^2$	6,62	0,0001
Resíduo (entre)	32	1174,3936	36,6998	$\sigma_d^2 + 7,9091\sigma_e^2$	1,12	0,3093
Resíduo (Dentro)	369	12140,4143	32,9009	σ_d^2		
Total	420	17912,2846				

Média=24,61 cm; CV_{dentro}=23,34%; CV_{entre}=24,65%; CV_{genético}=24,66%

Tabela 10: ANAVA para o caráter número de folíolos na primeira folha completa nas progênies de irmãos maternos desenvolvidas a partir de sementes provenientes do PNB.

FV	G.L.	SQ	QM	E (QM)	F	p
Blocos	2	12,4772	6,2386	$\sigma_d^2 + 4,1792\sigma_e^2 + 71,047\sigma_b^2$	1,35	0,2743
Progênies	17	1073,3643	63,1391	$\sigma_d^2 + 7,6061\sigma_e^2 + 22,457\sigma_p^2$	13,64	0,0001
Resíduo (entre)	32	148,1779	4,6306	$\sigma_d^2 + 7,9091\sigma_e^2$	0,92	0,5888
Resíduo (dentro)	369	1848,4604	5,0094	σ_d^2		
Total	420	3096,3373				

Média=4,16 folíolos; CV_{dentro}=53,81%; CV_{entre}=51,74%; CV_{genético}=77,61%

Como citado anteriormente, as estimativas dos coeficientes de parentesco pelo método de Lynch & Ritland (1999) mostraram-se congruentes com os valores esperados para meios-irmãos, principalmente quando os coeficientes de parentesco entre pares de indivíduos existentes dentro das famílias de irmãs maternas da casa de vegetação são observados de maneira global (Figura 3). Entretanto, é possível notar ainda que, dentro das famílias, existe uma grande variação entre os coeficientes de parentescos entre indivíduos (Figura 4). Essa variação indica a heterogeneidade de parentescos existentes dentro de famílias, o que não é considerado nos métodos tradicionais de obtenção de parâmetros de herança quantitativa. A mistura de parentescos dentro das famílias variou de quase 0 até 0,5, que seriam parentescos referentes à indivíduos desde pouco aparentados até indivíduos provenientes de autofecundação.

Essa variação existente provoca um erro nas estimativas de coeficientes de herdabilidade pelos métodos tradicionais (ANAVA), quando o modelo de meios-irmãos é admitido. Nesse caso, assume-se que toda a variância genética existente dentro de famílias equivale a $\frac{1}{4}$ da variância genética aditiva. A variância genética dentro de progênies é multiplicada por 4, para se obter a variância genética aditiva utilizada na estimação dos coeficientes de herdabilidade no sentido restrito. Como nem todas as plantas de uma família de irmãos-maternos obtida por polinização aberta são

efetivamente meios-irmãos ($r=0,125$), a estimativa de h^2 por ANAVA é provavelmente superestimada. Isso explicaria os coeficientes de herdabilidade com valores superiores a 1,0, estimados através dos componentes genéticos obtidos pela análise de variância.

Os coeficientes de herdabilidade para os quatro caracteres quantitativos de plantas juvenis mensurados na casa de vegetação, apresentaram valores significativamente diferentes de zero para praticamente todos os caracteres avaliados na população do PNB, para ambos os métodos de estimação (ANAVA e por marcadores moleculares). A única exceção ocorreu para o coeficiente de herdabilidade do caráter número de folíolos estimado por marcadores moleculares. O mesmo não ocorreu nas progênies provenientes do IBGE. A maioria dos caracteres não apresentou coeficientes de herdabilidade significativamente diferentes de zero com 95% de confiabilidade (Tabela 11).

Através da Tabela 11, é possível notar ainda que todos os coeficientes de herdabilidade estimados pelo método tradicional de ANAVA (admitindo-se o modelo de meios-irmãos) foram superiores aos estimados pelo método de marcadores, em que uma estimativa do coeficiente de parentesco existente entre os pares de indivíduos é considerada nos cálculos. Assim, acredita-se que tais estimativas de h^2 são mais próximas dos valores verdadeiros do que aquelas obtidas admitindo-se o modelo de meios-irmãos.

O método de estimação de coeficientes de herdabilidade através de marcadores moleculares possui a vantagem de não necessitar de experimentos com testes de progênie para a obtenção de tais estimativas (Mousseau et al., 1998, Ritland, 2000). A maior precisão nas estimativas de h^2 obtidas através do conhecimento de parentesco existente entre os indivíduos avaliados, é uma vantagem adicional desta metodologia, jamais obtida através dos métodos convencionais de obtenção de coeficientes de herdabilidade.

Tabela 11. Estimativas de herdabilidades para quatro caracteres de plantas jovens com um ano de idade desenvolvidas sob condições controladas, utilizando-se o método tradicional de análise de variância (ANAVA) e o método de marcadores moleculares (SSR). Os limites inferiores e superiores dos intervalos de confiança (IC) a 95% de probabilidade são mostrados ao lado de cada estimativa.

Pop.	Caráter	h^2 (SSR) (erro-padrão)	IC _{95%}	h^2 (ANAVA) (erro-padrão)	IC _{95%}
PNB	Folhas	0,1784	0,1143	0,4753	0,1521
		(0,1513)	0,4782	(0,1970)	0,7985
	Altura	0,4956	0,1860	0,8631	0,4507
		(0,1587)	0,8225	(0,2674)	1,2927
	Diâmetro	0,4556	0,1475	0,6888	0,0639
		(0,1611)	0,7765	(0,2376)	1,3163
	Folíolos	-0,0394	-0,3918	1,3770	0,8787
		(0,1761)	0,2981	(0,3246)	1,8999
IBGE	Folhas	0,0727	-0,2197	0,4084	-0,4855
		(0,1497)	0,3566	(0,1647)	1,3029
	Altura	0,6807	0,3890	1,4092	-0,4251
		(0,1544)	0,9984	(0,3410)	3,2311
	Diâmetro	-0,1250	-0,4340	0,7111	-0,6663
		(0,1547)	0,1781	(0,2348)	2,0871
	Folíolos	0,1069	-0,1795	0,7371	0,4895
		(0,1507)	0,4030	(0,2277)	1,9739

Para que não houvesse superestimativas na predição do ganho em programas de melhoramento genético, abordagem semelhante à utilizada neste trabalho poderia ser efetuada. Com o conhecimento do coeficiente de parentesco específico para cada par de indivíduos do experimento, seria possível a obtenção de estimativas de parâmetros de herança quantitativa mais acurados. Dessa forma, uma combinação entre o melhoramento

clássico e a utilização de tecnologia genômica seria realizada com o intuito de aprimorar as estimativas de predição do ganho durante o melhoramento.

Comparando os resultados dos coeficientes de herdabilidade para os caracteres avaliados nas duas populações, obtidos através de marcadores moleculares tanto para as progênies da casa de vegetação quanto para os regenerantes avaliados sob condições naturais, foi possível notar que tais resultados não seguiram um padrão de comportamento nem entre as populações, nem entre os caracteres. O mesmo ocorre se comparações numéricas forem realizadas entre os valores dos coeficientes de herdabilidade obtidos para as populações naturais, via marcadores genéticos, e para as progênies da casa de vegetação através dos métodos tradicionais de ANAVA (Tabelas 11 e 12).

Em experimento semelhante realizado com plantas anuais de *Mimulus guttatus*, Ritland & Ritland (1996) obtiveram estimativas de coeficientes de herdabilidade utilizando o método de marcadores genéticos muito superiores às obtidas pelos métodos tradicionais, comparando os resultados de h^2 do experimento sob condições controladas com os obtidos em populações naturais através de marcadores isoenzimáticos. Os autores associaram a superestimativa do parâmetro ao erro estatístico, inerente às estimativas do coeficiente de herdabilidade através de marcadores moleculares.

Nas Figuras 8 e 9 estão representadas todas as estimativas de coeficientes de herdabilidade obtidas através de marcadores moleculares com os dois métodos utilizados. É possível visualizar a distribuição das estimativas obtidas através do método de reamostragem (10.000 "bootstraps"). As distribuições das estimativas de herdabilidades para todos os caracteres foram aproximadamente simétricas, sugerindo uma forma aproximada à distribuição normal. Os erros dos parâmetros de herança quantitativa obtidos por reamostragem são pouco influenciados pelos valores estimados dos parâmetros em si (Tabelas 11 e 12). Daí a homogeneidade observada entre esses erros para os diferentes caracteres mensurados. Vale salientar que não é possível realizar este tipo de

inferência pelos métodos tradicionais de estimação da herdabilidade, quando a significância é, em geral, obtida admitindo-se a normalidade das estimativas.

Tabela 12. Estimativas de coeficientes de herdabilidade, utilizando marcadores moleculares SSR para quatro caracteres de plantas jovens com até um ano de idade amostradas no campo, obtidas através do modelo 1 e do modelo 2. Estimativas de inclinação da reta (b) e interseção (a) obtidas a partir do modelo 2. Os limites inferior e superior do intervalo de confiança são dados com 95% de probabilidade.

Pop.	Caráter	Modelo 1		Modelo 2			
		h^2	IC _{95%}	h^2	IC _{95%}	a	b
PNB	Folhas	0,9452 (0,1396)*	0,6789 1,2199	1,1081 (0,1567)	0,8072 1,4225	-0,0451 (0,0119)	0,0005 (0,0001)
	Altura	0,5340 (0,1590)	0,2268 0,8449	0,6193 (0,1750)	0,2820 0,9629	-0,0256 (0,0118)	0,0002 (0,0001)
	Diâmetro	1,0881 (0,1638)	0,7739 1,4129	1,1182 (0,1783)	0,7777 1,4756	-0,0094 (0,0114)	0,0001 (0,0001)
	Folíolos	0,0941 (0,1579)	-0,2144 0,4009	0,1103 (0,1779)	-0,2395 0,4601	-0,0086 (0,0120)	0,0000 (0,0001)
IBGE	Folhas	0,9697 (0,1433)	0,6950 1,2535	0,9081 (0,1509)	0,6196 1,2105	0,0201 (0,0104)	-0,0003 (0,0001)
	Altura	1,2152 (0,1327)	0,9601 1,4779	1,1381 (0,1385)	0,8719 1,4121	0,0263 (0,0099)	-0,0003 (0,0001)
	Diâmetro	1,0160 (0,1315)	0,7608 1,2794	0,9902 (0,1402)	0,7194 1,2715	0,0071 (0,0101)	-0,0001 (0,0001)
	Folíolos	0,3557 (0,1573)	0,0566 0,6739	0,3757 (0,1613)	0,0679 0,7026	-0,0112 (0,0010)	0,0001 (0,0000)

* entre parênteses, os erros-padrão estimados com base em 10.000 "bootstraps"

As estimativas de herdabilidades através de marcadores microssatélites para os caracteres quantitativos mensurados nas plântulas no campo, onde não havia o conhecimento do parentesco (Tabela 12), apresentaram valores congruentes entre os valores obtidos quando os efeitos ambientais compartilhados foram considerados (modelo 2) e aqueles obtidos quando os efeitos ambientais compartilhados não foram considerados (modelo 1).

Os valores de "a" representam a correlação ambiental existente entre os fenótipos dos indivíduos cuja distância física é teoricamente nula. Os valores obtidos para esta estimativa apresentaram erros muito elevados com a abordagem utilizada. Os valores de "b" (inclinação da reta) não foram considerados diferentes de zero (Tabela 12).

As estimativas dos coeficientes de herdabilidade de caracteres em populações naturais, quando os efeitos do ambiente compartilhado foi considerado (modelo 2), não diferiram muito daquelas em que não se considerou tais efeitos (modelo 1) (Tabela 12; Figuras 8 e 9). A mesma abordagem utilizada neste trabalho foi usada em estudos com peixes (salmão) por Mousseau et al. (1998). As estimativas tanto para herdabilidade quanto para correlações genéticas foram, assim como no presente trabalho, ora significativas, ora não estatisticamente diferentes de zero. Este é um indicativo de que não existe variação linear entre os efeitos ambientais. Portanto, não houve contribuição da distância para a melhoria das estimativas de coeficientes de herdabilidade dos caracteres avaliados sob condições naturais. Isso não ocorreu em populações de *Mimulus guttatus*, para as quais os coeficientes de herdabilidade simples (modelo 1) apresentaram valores 20% superiores aos obtidos considerando os efeitos ambientais compartilhados (modelo 2) (Ritland & Ritland, 1996).

Figura 8: Comportamento dos coeficientes de herdabilidade com base em 10.000 “bootstraps” para os caracteres número de folhas (A) e diâmetro do coleto (B) em plântulas provenientes da casa de vegetação (CV) e regenerantes de populações naturais (Reg.) de duas populações de *E. edulis*, estimados pelo método de marcadores moleculares considerando (modelo 2) ou não (modelo 1) os efeitos ambientais compartilhados entre indivíduos.

Figura 9: Comportamento dos coeficientes de herdabilidade com base em 10.000 “bootstraps” para os caracteres altura (A) e número de folíolos da primeira folha completa (B) em plântulas provenientes da casa de vegetação (CV) e regenerantes de populações naturais (Reg.) de duas populações de *E. edulis*, estimados pelo método de marcadores moleculares considerando (modelo 2) ou não (modelo 1) os efeitos ambientais compartilhados entre indivíduos.

Segundo o modelo 2 (Ritland, 1996a), a similaridade fenotípica entre um par de indivíduos é influenciada pelo ambiente compartilhado e por um componente genético comum (parentesco) existente entre eles. Quando o efeito ambiental compartilhado não influencia na estimativa do coeficiente de herdabilidade, pode estar ocorrendo uma das duas situações: ou o ambiente compartilhado entre o par de indivíduos realmente não influencia na similaridade fenotípica existente entre eles e, portanto, essa similaridade fenotípica é toda causada por efeitos genéticos; ou a variável utilizada para a mensuração do efeito ambiental compartilhado entre os indivíduos (no caso, distância física média) não explica tal efeito.

Comparando os resultados dos coeficientes de herdabilidade obtidos pelo método de marcadores genéticos (modelo 1) para as plântulas da casa de vegetação e do campo (tabelas 11 e 12), observa-se que os valores de h^2 obtidos para as plântulas do campo foi sempre superior aos obtidos na casa de vegetação. Este é um indicativo da existência de efeito ambiental influenciando a similaridade fenotípica do caráter mensurado entre pares de indivíduos. Entretanto, este efeito ambiental provavelmente não varia linearmente com o aumento da distância entre os indivíduos. Dessa forma, uma melhor modelagem do método deveria ser efetuada para a inclusão desses efeitos ambientais, a fim de considerá-los nas estimativas dos coeficientes de herdabilidade de caracteres quantitativos de populações naturais de *E. edulis*.

É possível dizer, portanto, que: i) o modelo 2 do método de Ritland (1996a) não foi eficaz para separar a variância ambiental que, provavelmente, está agregada à variância genética aditiva nas populações de *E. edulis* estudadas, devido ao compartilhamento de ambientes semelhantes entre indivíduos. Essa mistura de variâncias teve como consequência a superestimativa dos coeficientes de herdabilidade para caracteres mensurados sob condições naturais (Tabelas 11 e 12); ii) o conhecimento da distância física média (e não observada) entre plantas não foi suficiente para a obtenção de estimativas precisas através desse modelo.

Pelos resultados apresentados nas Tabelas 11 e 12 e na Figura 9A, foi possível notar que as estimativas de herdabilidade para altura, de um modo geral, apresentaram-se sempre positivas e estatisticamente significativas para as duas populações quando indivíduos do campo e da casa de vegetação foram avaliados. Estes resultados podem ser explicados através de duas hipóteses: i) alguns caracteres, como altura, são muito influenciados por um efeito materno existente quando plantas são avaliadas em estágios muito juvenis. Isto ocorre porque, geralmente, a germinação entre plântulas provenientes de uma mesma mãe (irmãs) ocorre simultaneamente, ou com diferença de alguns dias. Assim, uma variância entre progênies é observada devido ao estágio de maturação dos frutos e/ou germinação das sementes. Esse efeito materno é computado em conjunto com a variância genética durante a estimativa da herdabilidade. Assim, esta estimativa costuma ser alta em plantas jovens diminuindo a medida que os indivíduos envelhecem; ii) o fato dos outros caracteres, principalmente número de folíolos na primeira folha completa e número de folhas, possuírem poucas classes variantes, pode ter corroborado para a não significância das estimativas dos coeficientes de herdabilidade dos mesmos. O baixo número de classes variantes também ocorreu, porém em menor escala, no caráter diâmetro do coleto. Essa medida deveria ter sido tomada com maior número de casas decimais, para que a variância pudesse ser estimada com maior exatidão.

6.3.3. Correlações Genéticas

As correlações genéticas aditivas entre os caracteres quantitativos avaliados foram apresentadas na Tabela 13. Os erros inerentes a estas estimativas, assim como os referentes aos coeficientes de herdabilidade, foram considerados, de maneira geral, bastante elevados.

As correlações genéticas entre diâmetro x altura, altura x folhas e diâmetro x folhas apresentaram-se congruentes e significativos para as duas

populações avaliadas, tanto pelo método tradicional quanto pelo método de marcadores (modelos 1 e 2).

Tabela 13. Correlações genéticas aditivas entre os caracteres mensurados em plantas jovens na casa de vegetação e no campo, obtidas pelos métodos tradicionais (ANAVA) e pelo método de marcadores moleculares, através do modelo 1 e do modelo 2.

Pop.	Caracteres	Casa de Vegetação		Campo	
		(ANAVA)	(modelo 1)	(modelo 1)	(modelo 2)
PNB	diâmetro x altura	0,94(0,316) ^a	0,97 (0,143)	0,94 (0,190)	0,93 (0,097)
	diâmetro x folíolos	0,88 (0,330)	NE ^b (-)	1,31 (1,281)	1,23 (0,937)
	diâmetro x folhas	0,86 (0,913)	1,19 (0,746)	0,84 (0,047)	0,89 (0,046)
	altura x folíolos	0,91 (0,560)	NE (-)	1,69 (1,398)	1,60 (1,624)
	altura x folhas	0,88 (0,626)	1,07 (0,673)	0,97 (0,156)	0,98 (0,126)
	folíolos x folhas	1,02 (1,010)	NE (-)	0,92 (0,800)	0,94 (0,802)
IBGE	diâmetro x altura	0,64 (0,288)	NE (-)	0,98 (0,033)	0,98 (0,036)
	diâmetro x folíolos	0,40 (0,393)	NE (-)	-0,20 (0,271)	-0,18 (0,268)
	diâmetro x folhas	0,66 (0,708)	NE (-)	0,96 (0,047)	0,95 (0,052)
	altura x folíolos	0,06 (0,358)	2,05 (2,946)	-0,45 (0,375)	-0,43 (0,388)
	altura x folhas	0,58 (0,658)	-0,11 (0,519)	0,84 (0,053)	0,81 (0,059)
	folíolos x folhas	0,10 (1,089)	0,45 (2,632)	-0,35 (0,379)	-0,33 (0,384)

^a entre parênteses: erros-padrão das estimativas dos coeficientes de correlação genética

^b NE=correlação genética não estimável

De maneira geral, os coeficientes de herdabilidade para os caracteres de plântulas avaliados, apresentaram valores superiores aos esperados. Como os coeficientes de correlação genética são obtidos a partir dos valores de herdabilidade estimados para esses caracteres, era de se esperar que estes valores também se apresentassem elevados. Entretanto, foram estimáveis a partir da abordagem utilizada.

O principal objetivo do desenvolvimento de modelos para o estudo de herança quantitativa utilizando marcadores moleculares (Lynch & Ritland, 1999; Ritland, 1996a,b; Ritland, 2000) foi obter meios de avaliar a magnitude de parâmetros genéticos de caracteres quantitativos em populações naturais, abstendo-se da necessidade de manipulação experimental (Mousseau et al., 1998). Portanto, todos os resultados apresentados devem ser considerados com a ressalva de que nenhum

experimento de campo foi necessário para sua obtenção, denotando um grande avanço nas áreas de genética populacional e quantitativa para populações em condições naturais.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos e considerando as hipóteses levantadas e os objetivos propostos, as principais conclusões do presente trabalho, foram:

- 1) Os 18 locos SSR desenvolvidos para a espécie *Euterpe edulis* foram extremamente informativos e adequados na obtenção de estimativas de parâmetros genéticos populacionais de importância para a conservação da espécie; de coeficientes de parentesco entre pares de indivíduos; e da herança quantitativa em populações naturais, uma vez que apresentaram elevados valores estimados para diversidade gênica, heterozigosidade esperada e número médio de alelos por loco;
- 2) As probabilidades de identidade e de exclusão de paternidade combinada, obtidas para esta bateria de marcadores SSR, são um indicativo do poder desta ferramenta molecular para estudos de paternidade e identificação individual;
- 3) Sete dos 18 locos desenvolvidos para *Euterpe edulis* foram transferidos, com sucesso, para a espécie *Euterpe oleracea*, endêmica da região amazônica, permitindo estudos futuros desta espécie com o auxílio de marcadores microssatélites;
- 4) Os resultados obtidos na determinação do sistema reprodutivo indicaram ser as populações estudadas preferencialmente alógamas;
- 5) Uma estruturação genética entre populações foi detectada embora com valores reduzidos, resultados estes que vem a corroborar com a hipótese de existência de fluxo gênico entre as populações estudadas;
- 6) Um fluxo gênico inédito de 22 km foi detectado entre as populações estudadas, através de testes de paternidade, que mostraram probabilidades elevadas de duas plântulas regenerantes, de uma das populações estudadas serem filhas de adultos amostrados na outra população;

- 7) A análise de paternidade realizada entre indivíduos dentro de populações mostrou a existência de um maior sucesso reprodutivo de alguns indivíduos das populações;
- 8) Foi possível estimar os coeficientes de parentescos de Malécot existentes entre pares de indivíduos com o auxílio de marcadores moleculares do tipo microssatélites;
- 9) Os coeficientes de herdabilidade obtidos pelos métodos tradicionais de análise de variância se apresentaram superestimados em comparação aos obtidos pelo método de marcadores genéticos nos experimentos sob condições controladas. Estes resultados são provavelmente um indicativo da existência de parentescos superiores, dentro de progênes de irmãos maternos, aos supostos no modelo de estimativas de coeficientes de herdabilidade através de ANAVA;
- 10) Os coeficientes de herdabilidade estimados para as populações naturais indicaram uma baixa eficiência do modelo utilizado, no sentido de se detectar o grau de compartilhamento dos efeitos ambientais com base na distribuição entre os pares de indivíduos, uma vez que as estimativas de h^2 não foram influenciadas quando a contribuição da distância física entre indivíduos foi considerada nos cálculos;
- 11) As correlações genéticas aditivas entre os caracteres de plântulas de palmito avaliadas, tanto na casa de vegetação quanto nos indivíduos regenerantes amostrados nas populações naturais, apresentaram valores condizentes quando estimados pelos dois métodos (ANAVA e marcadores genéticos);
- 12) O método baseado em marcadores moleculares se mostrou adequado na avaliação da herança quantitativa em populações naturais, gerando subsídios para o pré-melhoramento de espécies arbóreas tropicais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKAYA, M.S.; SHOEMAKER, R.C.; SPECHT, J.E.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. **Crop Science**, v. 35, p.1439-45, 1995.
- ALDRICH, P.; HAMRICK, J.L.; CHAVARRIAGA, P.; KOCHERT, G. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 933-944, 1998.
- ALVAREZ-BUYLLA, E.R.; CHAOS, A.; PIÑERO, D.; GARAY, A.A. Demographic genetics of a pioneer tropical tree species: Patch dynamics, seed dispersal and seed banks. **Evolution**, v. 50, n.3, p. 1155-1165, 1996.
- ANJOS, A.; COUTO, H.T.Z; BATISTA, J.L.F.; REIS, A. Análise do efeito de um manejo em regime de rendimento sustentável sobre o padrão de distribuição espacial do palmitero (*Euterpe edulis* Martius), utilizando a função K de ripley. **Revista Árvore**, v. 22, n. 2, p. 215-225, 1998.
- BOSHIER, D.H.; CHASE, M.R.; BAWA, K.S. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 3. Gene flow, neighborhood, and population structure. **American Journal of Botany**, v. 82, n. 4, p. 484-490, 1995.
- BOVI, M.L.A.; GODOY JR, G. Juvenile-mature correlations in heart of palm plants. **Revista Brasileira de Genética**, v. 14, n. 3, p. 739-751, 1991.
- BOVI, M.L.A.; GODOY JR, G.; SÁES, L.A. Híbridos interespecíficos de palmitero (*Euterpe oleracea* x *Euterpe edulis*). **Bragantia**, v. 46, n. 2, p. 343-363, 1987.
- BROWN, A.H.D. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 52, p. 145-157, 1978.
- BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p. 816-827, 1998.

- CAMPOS, S.D.S.; BOVI, M.L.A.; IADEROSA, M. Caracterização do palmito obtido de algumas combinações híbridas entre açaí e juçara cultivadas sob diferentes condições. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 25, n. 5, p. 637-646. 1991.
- CARDOSO, M.; LEÃO, M. Estudos sobre o cultivo do palmito. **O Agrônomo**, v.26, p. 1-18, 1974.
- CHAKRABORTY, R.; MEAGHER, T.R.; SMOUSE, P.E. Parentage analysis with genetic markers in natural populations. I. The expected proportion of offspring with unambiguous paternity. **Genetics**, v. 118, p. 527-536, 1988.
- CHASE, M.R.; MOLLER, C.; KESSELI, R.; BAWA, K.S. Distant gene flow in tropical trees. **Nature**, n. 383, p. 398-399, 1996a.
- CHASE, M.R.; KESSELI, R.; BAWA, K.S. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal of Botany**, v. 83, n. 1, p. 51-57, 1996b.
- CIAMPI, A.Y. Desenvolvimento e utilização de marcadores microsatélites, AFLP e sequenciamento de cpDNA, no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de Copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em matas de galeria no cerrado. Botucatu, 1999. 204 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências / UNESP.
- COELHO, A.S.G. Modelos de genética biométrica no estudo de populações. In: ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 14, "Genética biométrica vegetal", Piracicaba, 1997. **Anais**. Piracicaba, v. 14, p. 12-19.
- COELHO, A.S.G. Departamento de Biologia Geral- Universidade Federal de Goiás. **Programa SANCHO**: sistema de análise para cálculo de herdabilidade e outros parâmetros (software). Goiânia, 2001.
- COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, v. 83, p. 748-756, 1999.

- COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, 2001./No prelo/
- CONDIT, R.; HUBBELL, S.P. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. **Genome**, v. 34, p. 746-57, 1991.
- CREGAN, P.B.; BHAGWAT, A.A.; AKKAYA, M.S.; RONGWEN, J. Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean. **Methods of Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 49-61, 1994.
- DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; BAWA, K.; KESSELI, R. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1585-1592, 1999.
- DEVLIN, B.; ELLSTRAND, N.C. The development and application of a refined method for estimating gene flow from angiosperm paternity analysis. **Evolution**, v. 44, n. 2, p. 248-259, 1990.
- DOW, B.D.; ASHLEY, M.V.; HOWE, H.F. Characterization of highly variable (GA/CT)_n micrasatellites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, p. 137-141, 1995.
- ECHT, C.S.; MAY-MARQUARDT, P. Survey of microsatellite DNA in pine. **Genome**, v. 40, p. 9-17, 1997.
- EGUIARTE, L.E.; PEREZ-NASSER, N.; PIÑERO, D. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. **Heredity**, v. 69, p. 217-228, 1992.
- EVETT, I. W.; GILL, P.D.; LAMBERT, J.A.; OLDROYD, N.; FRAZIER, R.; WATSON, S.; PANCHAL, S.; CONNOLLY, A.; KIMPTON, C. Statistical analysis of data for three British ethnic groups from a new STR multiplex. **International Journal of Legal Medicine**, v. 110, n. 1, p. 5-9, 1997.
- FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. Fourth edition. Longman Scientific & Technical, 1997. 464p.
- FANTINI, A.C.; NODARI, R.O.; REIS, M.S.; MANTOVANI, A.; ODORIZZI, J. e RIBEIRO, R.J. Estimativa da produção de palmito em plantas de palmitreiro

- (*Euterpe edulis* Martius) a partir de características fenotípicas. **Revista Árvore**, v. 21, n. 1, p. 49-57, 1997.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Embrapa-Cenargen, 1995. 220 p.
- GAIOTTO, F.A.; BRAMUCCI, M.; GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p. 842-849, 1997.
- GAIOTTO, F.A.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for Heart of Palm - *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Palmae). **Molecular Ecology**, 2001a. /no prelo/
- GAIOTTO, F.A.; GRATTAPAGLIA, D.; VENCovsky, R. Genetic structure, mating system and long distance gene flow in Heart of Palm (*Euterpe edulis* Mart. - Arecaceae) **Molecular Ecology**, 2001b. /no prelo/
- GALETTI, N.; FERNANDEZ, J.C. Palm heart harvesting in the Brazilian Atlantic forest: changes in industry structure and the illegal trade. **Journal of Applied Ecology**, v. 35, p. 294-301, 1998.
- GRATTAPAGLIA, D.; CIAMPI, A.Y.; GAIOTTO, F.A. et al. DNA technologies for forest tree breeding and conservation. In: **Recent advances in biotechnology for tree conservation and management**, Florianópolis, Brazil p. 50-61, 1997.
- GALETTI, M.; FERNANDEZ, C. Palm heart harvesting in the Brazilian Atlantic Forest: changes in industry structure and the illegal trade. **Journal of Applied Ecology**, v. 35, p. 294-301, 1998.
- GJERTSON, D.W.; MORRIS, J.W. Assessing probability of paternity and the product rule in DNA systems. **Genetica**, v. 96, p. 89-98, 1995.
- GLOWATZKI-MULLIS, M.L.; GAILLARD, C.; WIGGER, G.; FRIES, R. Microsatellite-based parentage control in cattle. **Animal Genetics**, v. 26, p. 7-12, 1995.
- GOODMAN, S.J. R_{ST} Calc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 881-885, 1997.

- GUERRA, M.P.; NODARI, R.O.; REIS, A. Considerações sobre o palmitero no sul do Brasil. **Ínsula**, v.14, p. 171-180, 1984.
- HABERL, M.; TAUTZ, D. Comparative allele sizing can produce inaccurate allele size differences for microsatellites. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1347-1350, 1999.
- HAIG, S.M. Molecular contributions to conservation. **Ecology**, v. 79, n. 2, p. 413-425, 1998.
- HAMRICK, J.L.; NASON, J.D. Consequences of dispersal in plants. In: RODHES, O. E. J.; CHESSER, R. K.; SMITH M. H. (Ed.) **Population dynamics in ecological space and time**. University of Chicago Press, 1996. p. 203-236.
- HEDRICK, P.W. Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. **Evolution**, v. 53, n. 2, p. 313-318, 1999.
- KAUFMAN, S.R.; SMOUSE, P.E.; ALVAREZ-BUYLLA, E.R. Pollen-mediated gene flow and differential male reproductive success in a tropical pioneer tree, *Cecropia obtusifolia* Bertol. (Moraceae): a paternity analysis. **Heredity**, v. 81, p. 164-173, 1998.
- KEMPTHORNE, O. **An Introduction to Genetic Statistics**, New York: John Wiley & Sons, 1957. 545p.
- LANDER, E.S. e SCHORK, N. Genetic dissection of complex traits. **Science**, v. 265, p. 2037-2048, 1994.
- LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data**. Version 1.0 (d15). Free program distributed by the authors over the Internet from the GDA Home Page at <http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/>, 2000.
- LINCOLN, S.E.; DALY, M.J.; LANDER, E.S. Whitehead Institute. **Programa Primer** (software). Cambridge, Massachusetts, 1991.
- LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 398-401, 1989.

- LOISELLE, B.A.; SORK, V.L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, v. 82, n. 11, p. 1420-1425, 1995.
- LYNCH, M.; RITLAND, K. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. **Genetics**, v. 152, p. 1753-1766, 1999.
- LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**, 1995. cap. 7, p. 131-176: Resemblance between relatives.
- MALÉCOT, G. **Les mathématiques de l'hérédité**. Paris: Masson et Cie., 1948. 80p.
- MATOS, D.M.S.; WATKINSON, A.R. The fecundity, seed, and seedling ecology of edible palm *Euterpe edulis* in southeastern Brazil. **Biotropica**, v. 30, n. 4, p. 595-603, 1998.
- MATOS, D.M.S.; FRECKLENTON, R.P.; WATKINSON, A.R. The role of density dependence in the population dynamics of a tropical palm. **Ecology**, v. 80, n. 8, p. 2635-2650, 1999.
- MATTOS, M.D.L.; MATTOS, C.C.L.V. Palmito Juçara - *Euterpe edulis* Mart (Palmae) - uma espécie a plantar manejar e proteger. **Brasil Florestal**, v. 7, n. 27, p. 9-20, 1976.
- MEAGHER, T.R. Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. 1. Identification of most-likely male parents. **The American Naturalist**, v. 128, n. 2, p. 199-215, 1999.
- MITCHELL, S.E.; KRESOVICH, S.; JESTER, C.A. et al. Application of multiplex PCR and fluorescence-based, semi-automated allele sizing technology for genotyping plant genetic resources. **Crop Science**, n. 37, p. 617-624, 1997.
- MIYAZAKI, Y.; ISAGI, Y. Pollen flow and the intrapopulation genetic structure of *Heloniopsis orientalis* on the forest floor as determined using microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, p. 718-723, 2000.
- MOUSSEAU, T.A.; RITLAND, K.; HEATH, D.D. A novel method for estimating heritability using molecular markers. **Heredity**, v. 80, p. 218-224, 1998.

- NASON, J.D.; HERRE, E.A.; HAMRICK, J.L. The breeding structure of a tropical keystone plant resource. **Nature**, v. 391, p. 685-687, 1998.
- ORLANDE, T.; LAARMAN, J.; MORTIMER, J. Palmito sustainability and economics in Brazil's Atlantic coastal forest. **Forest Ecology and Management**, v. 80, p.257-265, 1996.
- PAETKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLING, I.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular Ecology**, v. 4, p. 347-354, 1995.
- PARKER, P.G.; SNOW, A.A.; SCHUG, M.D. et al. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, v. 79, n. 2, p. 361-382, 1998.
- POWELL, W.; MACNRAY, G.C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in plant science**, v. 1, n. 7, p. 215-222, 1996.
- QUELLER, D.C.; STRASSMANN, J.E.; HUGHES, C.R. Microsatellites and kinship. **TREE**, v. 8, n. 8, p. 285-288, 1993.
- RAFALSKI, J.A.; VOGEL, J.M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in Plants. In: BIRREN, B.; LAI, E. (eds) **Nonmammalian genomic analysis: a practical guide**. Academic Press, New York, p. 75-134. 1996.
- REIS, M.S. Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmito (*Euterpe edulis* Martius). Piracicaba, 1996. 210 p. Tese (Doutorado) - Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade de São Paulo.
- REIS, M.S.; GUIMARÃES, E.; OLIVEIRA, G.P. Estudos preliminares da biologia reprodutiva do palmito (*Euterpe edulis*) em mata residual do Estado de São Paulo. In: Congresso Florestal Brasileiro, 7, Curitiba, **Anais**, p. 358-360, 1993.
- REIS, M.S.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Management of natural populations and maintenance of genetic diversity of *Euterpe edulis*, the heart-of-palm tree. In: **Recent advances in biotechnology for tree conservation and management**, Florianópolis, Brazil p.145-156, 1997.

- REIS, M.S.; CONDE, R.; FANTINI, A.C.; NODARI, R.O. Caracterização do incremento em diâmetro de *Euterpe edulis* Mart. e implicações para o seu manejo em formações florestais secundárias. **Revista Árvore**, v. 23, n. 4, p. 413-422, 1999.
- RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution**, v. 43, n. 4, p. 848-859, 1989.
- RITLAND, K. Gene identity and the genetic demography of plant populations. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. **Plant population genetics, breeding, and genetic resources**. 1989. cap. 11, p. 181-199.
- RITLAND, K. A series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems. **Journal of Heredity**, v. 81, p. 235-237, 1990.
- RITLAND, K. A marker-based method for inferences about quantitative inheritance in natural populations. **Evolution**, v. 50 p. 1062-73, 1996a.
- RITLAND, K. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. **Genetic Research**, v. 67, p. 175-85. 1996b.
- RITLAND, K. Marker-inferred relatedness as a tool for detecting heritability in nature. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1195-1204, 2000.
- RITLAND, K.; JAIN, S.K. A model for estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. **Heredity**, v. 47, p. 35-52, 1981.
- RITLAND, K.; RITLAND, C. Inferences about quantitative inheritance based on natural population structure in the yellow monkeyflower, *Mimulus guttatus*. **Evolution**, v.50, n. 3, p. 1074-1082, 1996.
- ROUSSET, F. Equilibrium values of measure of population subdivision for stepwise mutation process. **Genetics**, v. 142, p. 1357-1362, 1996.
- SAKAI, K.; HATAKEYAMA, S. Estimation of genetic parameters in forest trees without raising progeny. **Silvae Genetica**, v. 12, n. 5, p. 152-157, 1963.
- SCARIOT, A. Forest fragmentation effects on palm diversity in central Amazonia **Journal of Ecology**, v. 87, p. 66-76, 1999.
- SCHNABEL, A.; HAMRICK, J.L. Understanding the population genetic structure of *Gleditsia triacanthos* L.: the scale and pattern of pollen gene flow. **Evolution**, v. 49, n. 5, p. 921-931, 1995.

- SCHNABEL, A.; NASON, J.D.; HAMRICK, J.L. Understanding the population genetic structure of *Gleditsia triacanthos* L.: seed dispersal and variation in female reproductive success. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 819-832, 1998.
- SENIOR, L.M.; HEUN, M. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. **Genome**, v. 36, p. 884-89, 1993.
- SLATKIN, M. A Measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v. 139, p. 457-462, 1995.
- SMOUSE, P.E.; CHAKRABORTY, R. The use of restriction fragment length polymorphism in paternity analysis. **American Journal of Human Genetics**, v. 38, p. 918-939, 1986.
- SOUZA Jr., C.L. **Componentes da Variância Genética e suas Implicações no Melhoramento Vegetal**. Piracicaba: FEALQ, 1989. 134p.
- TERBORGH, J. Keystone plant in a tropical forest. In: SOULÉ, M.E. (Ed.) **Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity**. Sunderland: Sinauer, 1986.
- VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética Biométrica no Fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética, 1992. 486 p.
- VENCOVSKY, R.; CROSSA, J. Medidas de representatividade. In: BIOWORK, Viçosa, 1999. **Anais**. Viçosa, 1999.
- WEBER, J.L. Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphism. **Genomics**, v. 7, p. 524-530, 1990.
- WEBER, J.L.; WONG, C. Mutation of human short tandem repeats. **Human Molecular Genetics**, v.2, p. 1123-1128, 1993.
- WEIR, B.S. Sinauer Associates. **Programa: Genetic Data Analysis II** (software). Sunderland, MA, 1996. 445p.
- WHITE, G.; POWELL, W. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 851-860, 1997.
- WRIGHT, S. Coefficients of inbreeding and relationship. **American Naturalist**, v. 56, p. 330-338, 1922.