



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO



UNIDADE ACADÊMICA ESPECIALIZADA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS - UAECIA  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS**

---

DISSERTAÇÃO

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES E  
ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL DA *Copernicia prunifera* (Miller) H. E.  
Moore (ARECACEAE)**

LUCIANA GOMES PINHEIRO

Macaíba-RN

2015

**LUCIANA GOMES PINHEIRO**

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES E  
ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL DA *Copernicia prunifera* (Miller) H. E.  
Moore (ARECACEAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Almeida Vieira

Macaíba, 2015

Divisão de Serviços Técnicos  
Catalogação da Publicação na Fonte.  
Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias Campus Macaíba  
Biblioteca Setorial Professor Rodolfo Helinski

Pinheiro, Luciana Gomes.

Desenvolvimento de marcadores microssatélites e estrutura genética espacial da *Copernicia prunifera* (Miller) H. E. Moore (Arecaceae) / Luciana Gomes Pinheiro. – Macaíba, RN, 2015.

50 f. -

Orientador (a): Prof. Dr. Fábio de Almeida Vieira

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias Campus Macaíba. Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais.

1. Carnaúba – Dissertação. 2. Marcadores Moleculares - Dissertação. 3. Padrão Espacial – Dissertação. I. Vieira, Fábio de Almeida. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias Campus Macaíba. IV. Título.

RN/UFRN/BSPRH

CDU: 633.9

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES E ESTRUTURA  
GENÉTICA ESPACIAL DA *Copernicia prunifera* (Miller) H. E. Moore (ARECACEAE)**

**LUCIANA GOMES PINHEIRO**

Dissertação avaliada e aprovada pela Banca Examinadora:

Orientador:

---

Prof. Dr. Fábio de Almeida Vieira - UFRN/UAECIA

Examinadores:

---

Prof. Dr. Murilo Malveira Brandão - UNIMONTES

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Gouvêa Fajardo - UFRN/UAECIA

Data de aprovação:

\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

**MACAÍBA, RN**

**Dezembro/2015**

## **DEDICO**

Aos meus pais Paulo Barbosa Pinheiro  
e Maria Luziana Gomes Pinheiro.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida. Por nunca me abandonar, por ter me concedido a vida e me dado uma nova chance.

Aos meus pais Paulo e Luziana, e aos meus irmãos Lidiane e Marcos pela dedicação, cuidado, apoio e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu noivo George Lucas pelas palavras de incentivo e paciência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais.

Ao Prof. Dr. Fábio de Almeida Vieira pela orientação, atenção e por confiar e acreditar que eu seria capaz.

A Prof. Dra. Cristiane Gouvêa Fajardo pela ajuda ao longo de todo o trabalho e pelos conselhos não apenas acadêmicos.

A todos que fazem parte do Laboratório de Genética e Melhoramento Florestal (LabGeM) – UAECIA/UFRN pela ajuda e companheirismo ao longo dessa caminhada.

Sem vocês eu não teria conseguido... Obrigada!

A todos os Professores contribuíram para minha formação, crescimento profissional e pessoal.

A todos os meus amigos, pela força, companheirismo, apoio e incentivo. Em especial a Alana, por todos esses anos de amizade e companheirismo e a Kyvia por tudo que fez e faz por mim e pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse estudo.

“O Senhor é o meu pastor, nada me faltará”. (Salmos 23:1)

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	11
REFERÊNCIAS	12
Capítulo 1: DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA <i>Copernicia prunifera</i> (Miller) H. E. Moore (ARECACEAE)	13
RESUMO	13
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO	14
MATERIAL E MÉTODOS	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
CONCLUSÃO	21
AGRADECIMENTOS	21
REFERÊNCIAS	21
Capítulo 2: ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL DA <i>Copernicia prunifera</i> (Miller) H. E. Moore (Arecaceae) EM UMA POPULAÇÃO NATURAL	25
RESUMO	25
ABSTRACT	26
INTRODUÇÃO	26
MATERIAL E MÉTODOS	28
RESULTADOS	33
DISCUSSÃO	39
CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO	43
AGRADECIMENTOS	44
REFERÊNCIAS	44

## APRESENTAÇÃO

A presente dissertação está dividida em dois capítulos organizados em forma de artigos resultantes de estudos desenvolvidos com a espécie *Copernicia prunifera* (Miller) H. E. Moore.

O primeiro capítulo, que tem como título “Desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Copernicia prunifera* (Miller) H. E. Moore (Arecaceae)”, objetivou a construção de marcadores microssatélites (SSR) para serem utilizados em estudos de genética de populações de *Copernicia prunifera* e em outras espécies do gênero *Copernicia*. Será submetido ao periódico American Journal of Botany.

O Segundo capítulo tem como título “Estrutura genética espacial da *Copernicia prunifera* (Miller) H. E. Moore (Arecaceae) em uma população natural”. Teve como objetivo caracterizar o padrão demográfico e estrutura genética espacial entre os estágios de desenvolvimento de *Copernicia prunifera* em uma população natural e foi submetido a Flora.

## RESUMO

O presente estudo visou construir marcadores microssatélites (SSR) para *Copernicia prunifera*; e caracterizar o padrão demográfico e a estrutura genética espacial (EGE) em diferentes estágios de desenvolvimento de *C. prunifera* em uma população natural do Rio Grande do Norte (RN), utilizando marcadores moleculares ISSR. Foram desenvolvidos 17 pares de iniciadores SSR, os quais foram testados utilizando DNA proveniente de amostras de populações distintas. A estrutura demográfica e genética espacial foram avaliadas em uma parcela com área de 0,55 ha, onde todos os indivíduos foram georreferenciados. As análises moleculares utilizando marcadores microssatélites indicaram que todos os pares de iniciadores construídos, quando submetidos à PCR, amplificaram. Estes apresentaram tamanhos de pares de bases variando entre 113 e 250 bp. As análises demográficas mostraram um padrão de distribuição espacial agregado nas primeiras classes de distância, aleatório entre 40 e 50 m e segregado em distâncias mais elevadas. Dentre os 30 iniciadores ISSR testados, oito foram selecionados gerando um total de 102 locos, sendo 100 destes polimórficos. Entre os três estágios, os jovens apresentaram maior índice de diversidade genética de Nei ( $He = 0,37$ ), já o menor índice foi observado nos adultos reprodutivos ( $He = 0,34$ ). Os resultados da AMOVA mostraram maior diferenciação genética dentro dos estágios de desenvolvimento (98,61%) do que entre os estágios (1,39%). A população total ( $n = 161$ ) apresentou relação positiva e significativa de parentesco na primeira classe de distância (12,3 m). Os jovens apresentaram parentesco significativo até 10,5 m e negativo na quinta classe de distância (37,6 m). Os adultos não reprodutivos tiveram relação positiva de parentesco na primeira classe de distância (11,0 m) e distribuição aleatória dos genótipos nas demais classes. Os adultos reprodutivos apresentaram genótipos distribuídos espacialmente de maneira aleatória. Os valores para os testes de gargalo genético demonstraram que o número de locos com excesso de heterozigiosidade observado foi maior que o esperado. Os resultados da EGE refletem a dispersão restrita da espécie e os testes de gargalo genético a redução de genótipos provocados pela antropização dos ambientes naturais de *C. prunifera*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Carnaúba. Marcadores moleculares. Padrão espacial.

**ABSTRACT**

The present study aimed to develop microsatellite markers (SSR) for *Copernicia prunifera*; and characterize the demographic pattern and the spatial genetic structure (SGS) in different development stages of *C. prunifera* in a natural population of Rio Grande do Norte (RN) by using ISSR molecular markers. 17 SSR primers pairs were developed, which were tested by using DNA from samples of different populations. The demographic and genetic spatial structure was assessed in a plot with an area of 0.55 ha, where all individuals were georeferenced. The molecular analyses with the use of microsatellite markers pointed out that all built primers pairs, when submitted to PCR, had amplification. They showed sizes of base pairs ranging between 113 and 250 bp. The demographic analyses showed a clustered standard of spatial distribution in the first distance classes, random between 40 and 50 m and segregated in higher distances. Eight ISSR primers were used, thereby producing a total of 102 loci, with 100 of them being polymorphic. Among the three stages, the young showed the highest Nei's genetic diversity index ( $H_e = 0.37$ ); whilst the lowest index was found in the reproductive adults ( $H_e = 0.34$ ). The AMOVA results showed a greater genetic differentiation within the development stages (98.61%) in comparison to the interval among the stages (1.39%). The total population ( $n = 161$ ) showed a positive and significant relationship of kinship in the first distance class (12.3 m). The young showed a significant kinship up to 10.5 m and negative in the fifth distance class (37.6 m). The non-reproductive adults had a positive relationship of kinship in the first distance class (11.0 m) and random distribution of genotypes in the remaining classes. The reproductive adults showed genotypes spatially distributed in a random way. The values for the genetic bottleneck tests proved that the number of loci with excess observed heterozygosity was greater than expected. The SGS results reflect the restricted dispersion of the species, and the bottleneck tests reflect the reduction genotypes provoked by the anthropization of natural environments of *C. prunifera*.

**KEYWORDS:** Carnauba. Molecular markers. Spatial pattern.

## INTRODUÇÃO

A *Copernicia prunifera*, pertencente à família Arecaceae é uma espécie nativa da região semiárida do Nordeste do Brasil. Apresenta crescimento lento e sua propagação ocorre através da dispersão de sementes. Possui fruto arredondado com aproximadamente dois centímetros de comprimento que apresenta coloração escura quando maduro (BRAGA, 2001). É conhecida popularmente como carnaúba, nome derivado do Tupi que significa árvore que arranha devido à camada espinhosa que recobre o tronco, resultante da perda das folhas. Também pode ser chamada de carnaúva, carnaba e carnaíba (LIMA, 2006).

Possui grande importância para a economia da região devido aos múltiplos usos dos produtos dela extraídos, em especial a conhecida cera de carnaúba (GOMES et al., 2009). Além disso, a carnaúba também é usada na arborização e paisagismo. Devido a sua importância social e econômica, uma vez que praticamente todos os seus produtos podem ser utilizados, é conhecida também como “Árvore da vida” (LIMA, 2006).

Neste sentido, a antropização e os impactos causados pela exploração de espécies de áreas naturais tem como consequência alterações na estrutura e dinâmica populacional, aumento do grau de isolamento espacial, alteração do fluxo de pólen e endogamia (FUCHS; LOBO; QUESADA, 2003; SEBBEN et al., 2011). Assim, a destruição dos habitats naturais devido às atividades agrícolas desordenadas pode representar uma importante ameaça à sobrevivência em longo prazo das populações de *C. prunifera*.

Dessa forma, estudos do padrão de distribuição e variabilidade genética espacial poderão auxiliar no desenvolvimento de estratégias para o melhoramento, conservação e manejo da espécie. Nesse sentido, os marcadores moleculares são importantes ferramentas que colaboram com os estudos de genética de populações, e seu uso permite avaliar a variabilidade genética dentro e entre espécies e populações (BRANDÃO; VIEIRA; CARVALHO, 2011; BERED; BARBOSA NETO; CARVALHO, 1997).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos:

- i. Construir marcadores microssatélites (SSR) para estudos de genética de populações de *Copernicia prunifera*;
- ii. Caracterizar o padrão demográfico e estrutura genética espacial entre os estágios de desenvolvimento de *Copernicia prunifera* em uma população natural.

## REFERÊNCIAS

- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste Especialmente do Ceará**. Fundação Guimarães Duque. Coleção Mossoroense, Série C. v.1204, 2001.
- BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, v. 27, n. 3, p. 513-520, 1997.
- BRANDÃO, M. M.; VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Estrutura genética em microescala espacial de *Myrcia splendens* (Myrtaceae). **Revista Árvore**, v. 35, n. 5, p. 957-964, 2011.
- FUCHS, E. J.; LOBO, J. A.; QUESADA, M. Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. **Conservation Biology**, Boston, v.17, n.1, p.149-157, 2003.
- GOMES, J. A. F.; LEITE, E. R.; CAVALCANTE, A. C. R.; CÂNDIDO, M. J. D.; LEMPP, B.; BOMFIM, M. A. D.; ROGÉRIO, M. C. P. Resíduo agroindustrial da carnaúba como fonte de volumoso para a terminação de ovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 1, p. 58-67, jan. 2009.
- LIMA, G. A. **Carnaúba**. CONAB. Superintendência Regional do Ceará, Gerência de Desenvolvimento e Suporte Estratégico, Setor de Apoio a Logística e Gestão da Oferta. Fortaleza, CE, 2006, 3 p.
- SEBBEN, A. M.; CARVALHO, A. C. M.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, S. M. B.; GAINO, A. P. S. C.; SILVA, J. M.; JOLIVET, C.; MORAES, M. L. T. Low level of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**. v.106, n.1, p.134-145, 2011.

## **Capítulo 1: DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA *Copernicia prunifera* (Miller) H. E. Moore (ARECACEAE)**

### **RESUMO**

Marcadores baseados em Sequências Simples Repetitivas (SSR) ou microssatélites apresentam características que os fazem ser amplamente empregados em estudos de genética de populações. O presente estudo visou o desenvolvimento de marcadores microssatélites que poderão ser utilizados em estudos de genética de populações de *Copernicia prunifera*, bem como em outras espécies do mesmo gênero. Foram desenvolvidos 17 pares de iniciadores os quais apresentaram tamanhos de pares de bases variando entre 113 e 250 pb. Estes foram testados utilizando DNA proveniente de três matrizes de populações distintas e quando submetidos à PCR, todos amplificaram. As temperaturas de anelamento que apresentaram melhores padrões de amplificação encontram-se na faixa entre 52 e 59 °C. Os marcadores desenvolvidos serão úteis para estudos de genética de populações, diversidade genética, distribuição genética espacial e sistema de reprodução da *C. prunifera*, e poderão ser utilizados em estudos com outras espécies de *Copernicia*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Carnaúba. Marcadores moleculares. Sequências Simples Repetidas.

## **DEVELOPMENT OF MICROSATELLITES MARKERS FOR *Copernicia prunifera* (Miller) H. E. Moore (ARECACEAE)**

### **ABSTRACT**

Markers based on Simple Sequences Repeat (SSR) or microsatellites show characteristics that make them be largely used in genetic studies of populations. This study sought to develop microsatellite markers that may be used in genetic studies of populations of *Copernicia prunifera*, as well as in other species of the same genus. 17 SSR primers were developed, which showed sizes of base pairs ranging between 113 and 250 bp. They were tested with the use of DNA from three arrays of different populations and, when submitted to PCR, all amplified. The girdling temperatures that showed best amplification standards were inserted in the range between 52 and 59 °C. The developed markers will be appropriate for genetic studies of populations, genetic diversity, spatial genetic

distribution and system of reproductive of *C. prunifera*, and may be used in studies with other species of *Copernicia*.

KEYWORDS: Carnauba. Molecular markers. Simple Sequence Repeat.

## 1. INTRODUÇÃO

A família Arecaceae, cuja distribuição é predominantemente tropical, inclui mais de 240 gêneros e cerca de 2.600 espécies (LORENZI et al., 2004). No Brasil ocorrem aproximadamente 42 gêneros e 208 espécies. O gênero *Copernicia* apresenta cerca de 13 espécies, sendo a ilha de Cuba, no Caribe, seu centro de dispersão. No Brasil, o gênero conta com apenas duas espécies, a *C. prunifera* e *C. alba* (LORENZI et al., 2004). A carnaúba [*Copernicia prunifera* (Miller) H. E. Moore, Arecaceae] é uma palmeira cuja altura está entre 10 e 15 m, caule reto e cilíndrico com diâmetro entre 15 e 25 cm (HENDERSON; GALEANO; BERNAL, 1995), nativa do semiárido do Nordeste do Brasil, ocorrendo geralmente em monodominância, caracterizando os carnaubais.

A espécie apresenta diversos usos econômicos, sendo por isso conhecida como “Árvore da Vida” (GOMES et al., 2009). Dentre os seus produtos, o principal é a cera que recobre as folhas, principalmente as mais jovens, rica em triacantanol (TRIA), um álcool alifático de cadeia longa, que promove o crescimento de diversas culturas hortícolas (CHEN et al., 2002). A cera também é utilizada no revestimento de frutos *in natura* de maracujá-amarelo e goiaba (MOTA et al., 2006; RIBEIRO et al., 2005), na composição de produtos industriais como cosméticos, cápsulas de remédios, componentes eletrônicos, produtos alimentícios, ceras polidoras e revestimentos (CAVALCANTE; DINIZ, 2005; SILVA et al., 2009). As raízes, sementes e frutos apresentam uso medicinal e como nutriente para ração animal. A palha triturada é utilizada para proteção e resfriamento dos solos na agricultura, e ainda na fabricação de produtos artesanais como vassouras, bolsas, chapéus (ARRUDA; CALBO, 2004; SILVA; TASSARA, 1996).

A valorização e a comercialização dos produtos geram o aumento da exploração dos recursos florestais, causando impactos na vegetação e alteração das taxas de sobrevivência, crescimento e reprodução dos indivíduos coletados, modificando a estrutura e a dinâmica das populações (TICKTIN, 2004). Dessa forma, é necessário que haja estratégias de manejo, conservação e melhoramento de espécies florestais, considerando o modo de reprodução, o sistema de cruzamento e a estrutura genética nas

populações das espécies de interesse (VIEIRA; CARVALHO, 2008; VIEIRA et al., 2010), que podem ser inferidos por meio das estimativas de frequências genotípicas e alélicas.

Para isso, marcadores moleculares codominantes têm sido usados em estudos genéticos de populações naturais, principalmente na determinação de padrões de sistema reprodutivo e fluxo gênico (BITTENCOURT; SEBBENN, 2007; SEBBENN et al., 2011). Entre estes, 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. Possuem vantagens por serem abundantes e uniformemente distribuídos por todo o genoma; codominantes; multialélicos; apresentarem o maior conteúdo informativo por loco gênico entre todas as classes de marcadores moleculares (altamente polimórficos) (KALIA et al., 2011); facilmente obtidos através de ensaios de PCR (reação da polimerase em cadeia), possibilitando rápida avaliação de muitos indivíduos para um grande número de locos (NAZARENO; ZUCCHI; REIS, 2011); capazes de serem transferidos entre espécies de um mesmo gênero (NAZARENO et al., 2009); e uma vez desenvolvidos, podem ser compartilhados entre diferentes laboratórios.

Pequenas quantidades de DNA são suficientes para a análise desses marcadores, e esses, por serem multialélicos, apresentam resultados surpreendentes para questões reprodutivas, evolutivas e conservacionistas (HEDRICK, 1999). Durante o processo de obtenção de pares de iniciadores que amplifiquem regiões repetitivas de microssatélites, são necessários passos de caracterização de abundância de diferentes motivos repetitivos (“motifs”), construções de bibliotecas e sequenciamento de DNA (BACON et al., 2011; NAZARENO; ZUCCHI; REIS, 2011, 2011).

Dessa forma, o presente estudo visou à construção de marcadores microssatélites (SSR) que poderão ser utilizados em estudos de genética de populações de *Copernicia prunifera*, bem como em outras espécies do mesmo gênero.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Construção da biblioteca Genômica**

A construção da biblioteca foi realizada com base no protocolo de Billotte et al. (1999). O DNA genômico foi extraído de amostras de tecido foliar de indivíduos de *Copernicia prunifera* oriundos de populações naturais do estado do Rio Grande do Norte, através do método descrito por Doyle e Doyle (1987).

O DNA genômico foi digerido utilizando-se enzima de restrição RsaI e os fragmentos obtidos foram ligados a adaptadores (Rsa21 - 5' CTC TTG CTT ACG CGT GGA CTA 3' e Rsa25 - 5' TAG TCC ACG CGT AAG CAA GAG CAC A 3'). Foi realizada uma pré-amplificação via PCR e os fragmentos obtidos foram purificados com o uso do kit de purificação de PCR QIAquick (QIAGEN). Os fragmentos de DNA contendo microssatélites foram hibridizados por meio de uma sonda marcada com biotina, seguida pela captura das sequências selecionadas por beads magnéticas ligadas a estreptavidina.

Os fragmentos selecionados foram amplificados por meio de uma reação de PCR, e em seguida clonados em um vetor pGEM – T easy (Promega) e submetidos novamente a reação de PCR a fim de checar a clonagem. Após a ligação ao vetor, houve a transformação em células XL1-Blue competentes a fim de proporcionar a amplificação do inserto. As células transformadas foram cultivadas em meio de cultura Luria-Bertani (LB) contendo ampicilina a  $100 \text{ mg.mL}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ . Em seguida o DNA plasmidial das colônias recombinantes foi isolado e sequenciado em sequenciador automático a fim de amplificar insertos contendo microssatélites.

As sequências obtidas foram transformadas em formato “FASTA”, e posteriormente submetidas ao programa *WebSat* (<http://wsmartins.net/websat/>) a fim de identificar as regiões contendo microssatélites (MARTINS et al., 2009).

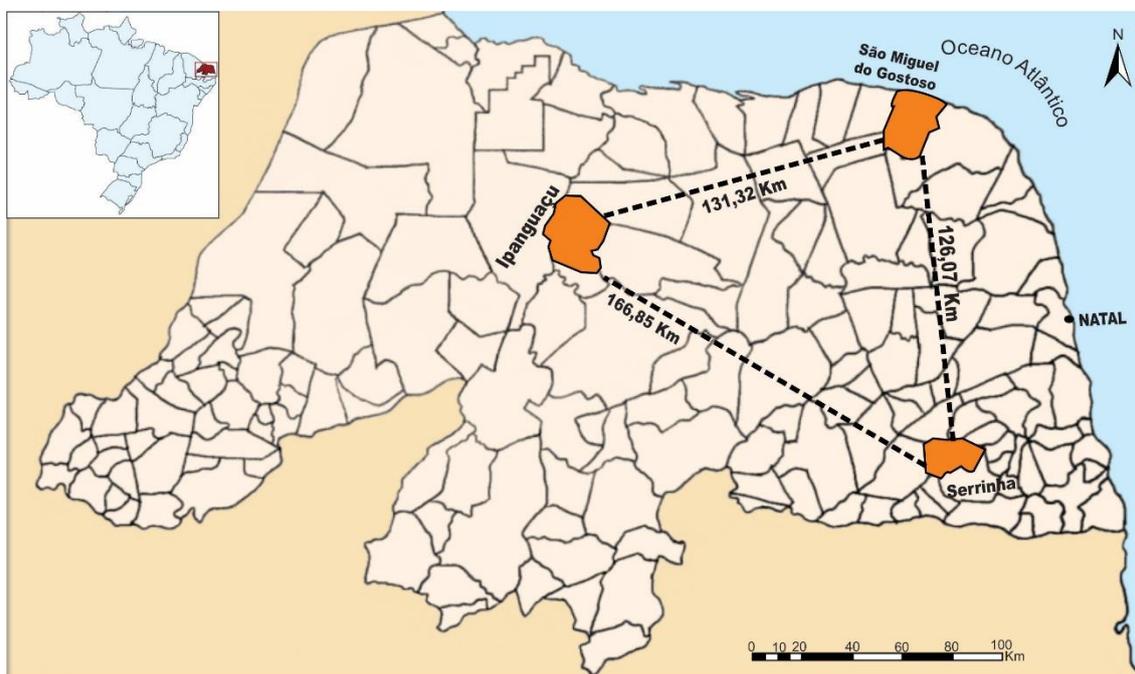
Após a identificação das regiões microssatélites, os iniciadores direto (F) e reverso (R) foram desenhados utilizando o programa *Primer3* d(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (ROZEN; SKALETSKY, 2000), e seguindo critérios como não conter bases redundantes; a distância dos SSRs estar entre 20 e 60 pb; ser constituídos por 18 a 22 nucleotídeos sem sequências repetitivas; conter uma porcentagem de bases G e C entre 40 a 60%; começar em 5' e terminar em 3' com duas bases G, ou C, ou G e C, se possível; e ter temperatura de anelamento entre  $45$  e  $60^\circ\text{C}$ , com diferença máxima de  $1^\circ\text{C}$  entre as temperaturas dos iniciadores F e R, para que possam ser utilizados na mesma reação e não hibridizarem entre si, ou se autohibridizarem.

Os iniciadores construídos foram nomeados com um código que faz referência a espécie (Cop) e enumerados de 01 a 17.

## **2.2. Teste dos iniciadores construídos**

Os 17 pares de iniciadores construídos foram testados utilizando DNA proveniente de três matrizes de *C. prunifera* de populações distintas, a fim de verificar

alterações na região de anelamento do iniciador. As matrizes amostradas localizavam-se nos municípios de São Miguel do Gostoso, Serrinha e Ipanguaçu, estado do Rio Grande do Norte (Figura 1). A extração do DNA foi realizada de acordo com o método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987). Após a extração, o DNA obtido foi quantificado com auxílio do espectrofotômetro Epoch.



**Figura 1:** Localização geográfica das matrizes das diferentes populações de *C. prunifera*, no estado do Rio Grande do Norte.

**Fonte:** Adaptado de <http://www.lookingformaps.com>

As reações de PCR foram realizadas em termociclador Veriti 96 poços, em um volume final de 15  $\mu$ L, contendo 1X do tampão (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM KCl), 0,7  $\mu$ M de cada par de iniciador, 250  $\mu$ M de cada dNTPs, 1 U de Taq DNA polimerase, 0,25 mg de BSA, 1,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, e 9 ng de DNA.

O protocolo de PCR consistiu de uma prévia desnaturação inicial a 94 °C por 5 min (um ciclo), seguida por 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 1 min para anelamento (que variaram entre 50 e 62 °C) e 72 °C por 1 min, em seguida, uma etapa de extensão final a 72 °C por 30 min (um ciclo).

O produto da amplificação foi checado por eletroforese em gel de agarose a 3,0% e GelRed como corante, em tampão Tris-Acetato-EDTA 1x (TAE), a uma voltagem de 100 V, por duas horas e meia utilizando o marcador de peso molecular (Ladder) de 1 kb.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

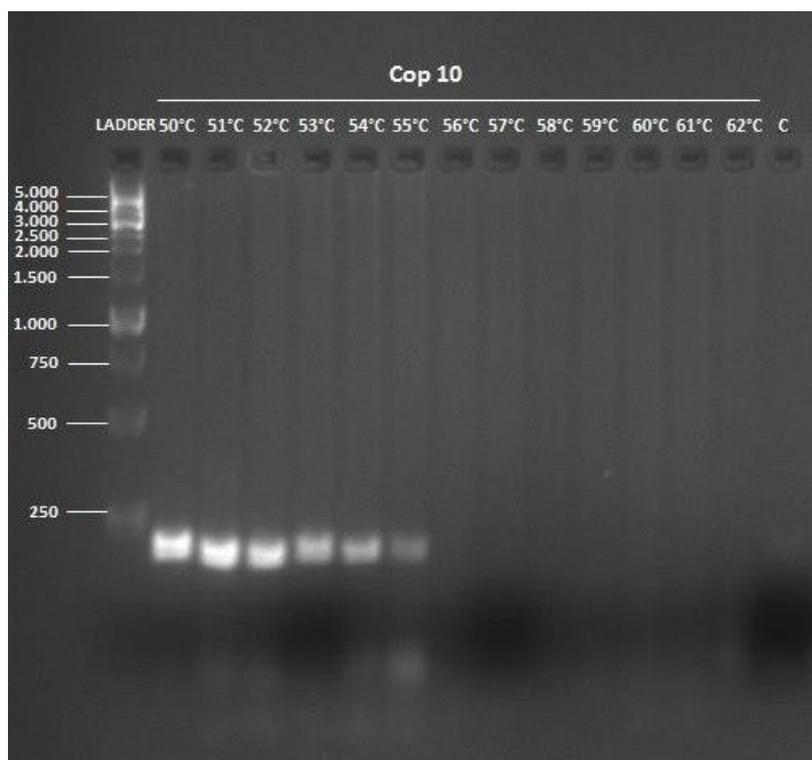
Os 17 pares de iniciadores construídos apresentaram tamanhos de pares de bases variando entre 113 e 250 bp (Tabela 1). Quando submetidos à reação em cadeia da polimerase, todos os iniciadores amplificaram.

**Tabela 1:** Características de 17 locos microssatélites desenvolvidos para *Copernicia prunifera* do estado do Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil. Nome do locos, sequência do iniciador (F: direto, R: reverso), sequência repetida, tamanho do fragmento em pares de bases (pb) e temperatura de anelamento ( $T_a$ ).

Locos		Sequência (5'-3')	Sequência repetida	Tamanho dos fragmentos (bp)	$T_a$ (°C)
Cop01	F:	AATTTACCCTTCTGGAGCATCA	(TCT)8	152	52
	R:	CGCAACCTCATCTCCTTCA			
Cop02	F:	TGAGAAAGACGCACAACCAG	(ATA)4	194	52
	R:	AAGCAACTGTGACCCCACTC			
Cop03	F:	GGAGTTTCAGCCAAGTTAGCC	(GA)21	168	55
	R:	CATGGGTAGCGTGACCTTCT			
Cop04	F:	GCAATAACCACCTCTGCAT	(CT)17...(TG)3(TA)6	156	56
	R:	TGTGATGGTGAGGACACTCAA			
Cop05	F:	CCCAGAGGCAGAGCAAATAG	(TA)6	166	54
	R:	AGCCATTCCTGGTTACTCATT			
Cop06	F:	ACACAACCTTGCTGCCCAATA	(TC)13...(CA)11	173	52
	R:	GACCGAAAGTTGTTGACTAAAG			
Cop07	F:	GCCTGACGGACAATCAGAAA	(TA)5 (TG)19	158	59
	R:	GGCTTGCTCAATCAAGTCCA			
Cop08	F:	CCATATGGTCGACCTGTCA	(CT)14	242	53
	R:	GGGGGCTAGTGTGGGTAG			
Cop09	F:	CTCGTCTAACACTCGTATCTTGGT	(AC)9 (TC)8	169	54
	R:	ACACGGGGAGGTAGTGACAA			
Cop10	F:	AAAGTCTCAAAGTTTCTCTACTCA	(CT)25	167	52
	R:	TGTGACATCTTCCATGCTTC			
Cop11	F:	TGACATTTGTCACTTGTCTTACTCT	(CT)19	198	52
	R:	AGAGATCGTTCCCACAAAGA			
Cop12	F:	CTTGCCATTGAGTCAGCTTG	(CT)18	155	52
	R:	GTGAAGGCTTTCGAGTACGG			
Cop13	F:	AATGAGGAGGAGTTGGGTTT	(GT)16	113	54
	R:	ACTTTGCAAACCTGCTTTATTCC			
Cop14	F:	GACGTTGTATGGAGCCCACT	(CT)8	184	55
	R:	TTGCTAGGGGAATCATGAGG			
Cop15	F:	CAGGCCAGCATCACAAGAT	(ATAA)5	250	55
	R:	CCCACGACAAAAACAGTGG			
Cop16	F:	GGGTTTGAGCCTTTCATTCTC	(TTAA)4...(TTAA)4	213	55
	R:	AGTGGACTTCCCTCATGG			
Cop17	F:	ACTCGGACTCTCCACTCTCG	(AGA)9	157	56
	R:	TCTTCCCAAGCCTCATAGA			

A Figura 2 mostra o gel de agarose fotografado sob luz ultravioleta com o perfil de amplificação de um dos iniciadores construídos. As temperaturas de anelamento que

apresentaram melhores padrões de amplificação encontram-se na faixa entre 52 e 59 °C, conforme a Tabela 1.



**Figura 2:** Padrão de fragmentos resultante da amplificação do iniciador Cop 10 em *Copernicia prunifera*.

Estudos realizados com diferentes espécies de *Arecaceae* demonstram a ocorrência de uma amplitude das faixas de temperatura e a variação dessas temperaturas entre os diferentes gêneros de uma mesma família. Montufar et al. (2007) em uma pesquisa com *Oenocarpus bataua* Martius definiram 55 °C como temperatura de anelamento do marcador SSR. Já Bacon et al. (2011) em um estudo de construção de iniciadores para *Pritchardia martii* (Gaudich.) H. Wendl. utilizaram temperaturas de anelamento que variaram de 49 a 58 °C, enquanto Federman et al. (2012) trabalhando com *Mauritia flexuosa* L.f. selecionaram temperaturas entre 54 a 57 °C. Essa variação deve-se ao fato de que em alguns gêneros, temperaturas mais elevadas permitem a redução de sequências inespecíficas e a otimização da sequência alvo, enquanto que para outros, as menores temperaturas favorecem a amplificação da sequência alvo e a minimização das sequências inespecíficas, como é o caso do presente estudo.

Estudos tem demonstrado a capacidade de transferência de microssatélites entre espécies de um mesmo gênero. Bacon et al. (2011) utilizando microssatélites

desenvolvidos para *Pritchardia martii* obtiveram altas taxas de transferibilidade entre as espécies de *Pritchardia*. Ramos et al. (2012) encontraram resultados semelhantes com iniciadores desenvolvidos para *Astrocaryum aculeatum* Meyer, verificando a eficiência da transferência dos iniciadores construídos para outras espécies de Arecaceae. Logo, os iniciadores desenvolvidos no presente estudo possivelmente poderão ser utilizados em diferentes espécies de *Copernicia*, subsidiando pesquisas futuras.

Como continuidade deste estudo, torna-se necessário selecionar os iniciadores mais adequados para amplificar sequências de microssatélites no DNA da espécie. Esta seleção se dá por meio da determinação, em sequenciador automático, para obtenção de locos polimórficos.

## 5. CONCLUSÃO

Todos os iniciadores construídos, quando submetidos à reação em cadeia da polimerase, amplificaram mostrando assim sua eficiência para o DNA testado. Estes serão úteis para pesquisas posteriores em genética de populações, diversidade genética, distribuição genética espacial e sistema de reprodução da *Copernicia prunifera*, possibilitando o desenvolvimento de práticas de manejo e conservação da espécie nas áreas de ocorrência. Os iniciadores obtidos provavelmente poderão ser utilizados em estudos com outras espécies do gênero *Copernicia*.

## 6. AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Florestais da UFRN (PPGCFL/UFRN) e a Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## 7. REFERÊNCIAS

- ARRUDA, G. M. T.; CALBO, M. E. R. Efeitos da inundação no crescimento, trocas gasosas e porosidade radicular da carnaúba (*Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore). **Acta Botânica Brasilíca**, Brasília, v. 18, n. 2, p. 219-224, 2004.
- BACON, C. D.; JOHNSON, G. P.; MEIMBERG, H.; PUPPO, P.; SIMMONS, M.; WAGNER, W. L. Development of microsatellites in the Hawaiian endemic palm *Pritchardia martii* (Arecaceae) and their utility in congeners. **American Journal of Botany**, p. 139-140, v. 98, n.6, jun. 2011.

BILLOTTE, N.; LAGODA, P. J. L.; RISTERUCCI, A. M.; BAURENS, F. C. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, v. 54, n. 4, p. 277-288, 1999.

BITTENCOURT, J.V.M.; SEBBENN, A.M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the windpollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, p.580–591, 2007.

CAVALCANTE, C. R.; DINIZ, S. F. O estudo da carnaúba no ensino de geografia no município de Coreaú – CE. **Revista da Casa da Geografia de Sobral**, Sobral, v.6/7, n.1, p. 141-150, 2005.

CHEN, X.; YUAN, H.; CHEN, R.; ZHU, L.; DU, B.; WENG, Q.; HE, G. Isolation and characterization of Triacantanol – regulated genes in rice (*Oriza sativa* L.): possible role of Triacantanol as a plant growth stimulator. **Plant and Cell Physiology**, v.43, n.8, p. 869-876, aug. 2002.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1, p.: 13-15, 1987.

FEDERMAN, S.; HYSENI, C.; CLEMENT, W.; CACCONE, A. Isolation of 13 novel highly polymorphic microsatellite loci for the Amazonian Palm *Mauritia flexuosa* L.f. (Arecaceae). **Conservation Genetics Resources**, v.4, n. 2, jun. 2012, p. 355-357, 2012.

GOMES, J. A. F.; LEITE, E. R.; CAVALCANTE, A. C. R.; CÂNDIDO, M. J. D.; LEMPP, B.; BOMFIM, M. A. D.; ROGÉRIO, M. C. P. Resíduo agroindustrial da carnaúba como fonte de volumoso para a terminação de ovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 1, p. 58-67, jan. 2009.

HEDRICK, P. W. Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. **Evolution**, v. 53, n. 2, p. 313-318, 1999.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. **Field guide to the palms of the Americas**. New Jersey: Princeton University Press, 1995. 351 p.

KALIA, R. K.; RAI, M. K., KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v.177, p.309-334, 2011.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; COSTA, J. T. M.; CERQUEIRA, L. S. C.; FERREIRA, E. **Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas**. Editora Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2004, 432 p.

MARTINS, W. S.; LUCAS, D. C. S.; NEVES, K. F. S.; BERTIOLI, D. J. WebSat – A Web Software for MicroSatellite Marker Development. **Bioinformatics**, v. 3, n. 6, p. 282-283, 2009.

MONTUFAR, R.; MARIAC, C.; PHAM, J. L.; PINTAUD, J. C. Isolation of 23 polymorphic microsatellite loci in the Neotropical palm *Oenocarpus bataua* Martius (Arecaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v.7, n. 6, p. 75-78, nov. 2007.

MOTA, W. F.; SALOMÃO, L. C. C.; NERES, C. R. L.; MIZOBUTSI, G. P.; NEVES, L. L. M. Uso de cera de carnaúba e saco plástico poliolefínico na conservação pós-colheita do maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p.190-193, ago. 2006.

NAZARENO, A. G.; PEREIRA, R. A. S.; FERES, J. M.; MESTRINER, M. A.; ALZATE-MARIN, A. L. Transferability and characterization of microsatellite markers in two Neotropical *Ficus* species. **Genetics and Molecular Biology**, v.32, n.3, p.568-571, 2009.

NAZARENO, A. G.; ZUCCHI, M.I.; REIS, M. S. Microsatellite markers for *Butia eriospatha* (Arecaceae), a vulnerable palm species from the Atlantic Rainforest of Brazil. **American Journal of Botany**, v.98, n.7, p.198-200, jul. 2011.

RAMOS, S. L. F. MACÊDO, J. L. V.; LOPES, M. T. G.; BATISTA, J. S.; FORMIGA, K. M.; SILVA, P. P.; SAULO-MACHADO, A. C.; VEASEY, E. A. Microsatellite loci for tucumã of Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) and amplification in other *Arecaceae*. **American Journal of Botany**. V.99, n.12, p. 508-510, dez. 2012.

RIBEIRO, V. G.; ASSIS, J. S.; SILVA, F. F.; SIQUEIRA, P. P. X.; VILARONGA, C. P. P. Armazenamento de goiabas ‘paluma’ sob refrigeração e em condição ambiente, com e sem tratamento com cera de carnaúba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n.2, p. 203-206, ago. 2005.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETE S, MISENER S (Eds) **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. New Jersey: Humana Press, p.365-386, 2000.

SEBBENN, A. M.; CARVALHO, A. C. M.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, S. M. B.; GAINO, A. P. S. C.; SILVA, J. M.; JOLIVET, C.; MORAES, M. L. T. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, v.106, n.1, p.134-145, jan. 2011.

SILVA, F. D. B.; MEDEIROS FILHO, S.; BEZERRA, A. M. E.; FREITAS, J. B. S.; ASSUNÇÃO, M. V. Pré-embebição e profundidade de semeadura na emergência de *Copernicia prunifera* (Miller) H. E Moore. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v.40, n.2, p. 272-278. abr.- jun. 2009.

SILVA, S.; TASSARA, H. **Frutas no Brasil**. 4. ed. São Paulo: Empresa das Artes, 1996. 321p.

TICKTIN, T. The ecological implications of harvesting non-timber forest products. **Journal of Applied Ecology**, v. 41, p. 11-21, 2004.

VIEIRA F. A.; APPOLINÁRIO V.; FAJARDO C. G.; CARVALHO, D. Reproductive biology of *Protium spruceanum* (Burseraceae), a dominant dioecious tree in vegetation corridors in Southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n.4, p.711-715, out.-dez. 2010.

VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Genetic structure of an insect-pollinated and bird-dispersed tropical tree in vegetation fragments and corridors: implications for conservation. **Biodiversity and Conservation**, v. 17, p. 2305-2321, set. 2008.

## Capítulo 2: ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL DA *Copernicia prunifera* (Miller) H. E. Moore (Arecaceae) EM POPULAÇÃO NATURAL

Luciana Gomes Pinheiro<sup>a</sup>, Kyvia Pontes Teixeira das Chagas<sup>b</sup>, Cristiane Gouvêa Fajardo<sup>c</sup>, Fábio de Almeida Vieira<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Estudante de Pós-graduação em Ciências Florestais da UFRN, <sup>b</sup>Estudante de Graduação em Engenharia Florestal da UFRN, <sup>c</sup> Doutora em Ecologia pela UFRN, <sup>d</sup>Professor Doutor da Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias da UFRN

### RESUMO

O presente estudo objetivou caracterizar o padrão demográfico e a estrutura genética espacial (EGE) em diferentes estágios de desenvolvimento de *Copernicia prunifera* em população natural do Rio Grande do Norte (RN), utilizando marcadores moleculares ISSR. Foram amostrados e georreferenciados todos os indivíduos em uma parcela com área de 0,55 ha. As análises demográficas mostraram um padrão de distribuição espacial agregado nas primeiras classes de distância, aleatório entre 40 e 50 m e segregado em distâncias mais elevadas. Dos 30 iniciadores ISSR testados, oito foram selecionados gerando um total de 102 locos, sendo 100 polimórficos. Entre os três estágios, os jovens apresentaram maior índice de diversidade genética de Nei ( $He = 0,37$ ), já o menor índice foi observado nos adultos reprodutivos ( $He = 0,34$ ). Os resultados da AMOVA mostraram maior diferenciação genética dentro dos estágios de desenvolvimento (98,61%) do que entre os estágios (1,39%). A população total ( $n = 161$ ) apresentou relação positiva e significativa de parentesco na primeira classe de distância (12,3 m). Os jovens apresentaram parentesco significativo até 10,5 m e negativa na quinta classe de distância (37,6 m). Os adultos não reprodutivos tiveram relação positiva de parentesco na primeira classe de distância (11,0 m) e distribuição aleatória dos genótipos nas demais classes. Os adultos reprodutivos apresentaram genótipos distribuídos espacialmente de maneira aleatória. Os valores para os testes de gargalo genético demonstraram que o número de locos com excesso de heterozigiosidade observado foi maior que o esperado. Os resultados da EGE refletem a dispersão restrita da espécie e, os testes de gargalo, a redução de genótipos provocados pela antropização dos ambientes naturais de *C. prunifera*.

PALAVRAS-CHAVE: Carnaúba. Marcadores moleculares. Padrão espacial.

## **SPATIAL GENETIC STRUCTURE OF *Copernicia prunifera* (Miller) H. E. Moore (Arecaceae) in a NATURAL POPULATION**

### **ABSTRACT**

This study aimed at characterizing the demographic pattern and the spatial genetic structure (SGS) in different development stages of *C. prunifera* in a natural population of Rio Grande do Norte (RN) by using ISSR molecular markers. All individuals were sampled and georeferenced in a plot with an area of 0.55 ha. The demographic analyses showed a clustered standard of spatial distribution in the first distance classes, random between 40 and 50 m and segregated in higher distances. Of the 30 ISSR primers tested, eight were selected, thereby producing a total of 102 loci, with 100 of them being polymorphic. Among the three stages, the young showed the highest Nei's genetic diversity index ( $H_e = 0.37$ ); whilst the lowest index was found in the reproductive adults ( $H_e = 0.34$ ). The ANOVA results showed a greater genetic differentiation within the development stages (98.61%) in comparison to the interval among the stages (1.39%). The total population ( $n = 161$ ) showed a positive and significant relationship of kinship in the first distance class (12.3 m). The young showed a significant kinship up to 10.5 m and negative in the fifth distance class (37.6 m). The non-reproductive adults had a positive relationship of kinship in the first distance class (11.0 m) and random distribution of genotypes in the remaining classes. The reproductive adults showed genotypes spatially distributed in a random way. The values for the genetic bottleneck tests proved that the number of loci with excess observed heterozygosity was greater than expected. The SGS results reflect the restricted dispersion of the species, and the bottleneck tests reflect the reduction of genotypes provoked by the anthropization of natural environments of *C. prunifera*.

**KEYWORDS:** Carnaúba. Molecular markers. Spatial pattern.

### **INTRODUÇÃO**

A distribuição espacial das espécies vegetais está relacionada com as formas de reprodução, interações entre os membros da comunidade e a ocorrência de fatores ambientais que interferem nessa distribuição (BORCARD; LEGENDRE; DRAPEAU, 1992), havendo em muitos casos uma diminuição da concentração de indivíduos a medida

que há o aumento da idade devido a remoção de indivíduos por meio da competição (EPPERSON; ALVAREZ-BUYLLA, 1997; VIEIRA et al., 2012).

Por meio do estudo da distribuição espacial é possível visualizar a disposição dos indivíduos em um determinado ambiente, sendo essa organização, por sua vez, fruto da interação entre os fatores bióticos e abióticos que conduzem os processos ecológicos naquele ambiente (CONDIT et al., 2000; VIEIRA et al., 2012). Esse tipo de análise atua como mecanismo para compreensão de processos genéticos e ecológicos das populações florestais (VIEIRA et al., 2010; GAINO et al., 2010; ITOH et al., 2003).

A caracterização da estrutura genética espacial (EGE) é uma ferramenta importante na conservação e manejo de populações vegetais. Assim, o conhecimento dos padrões de distribuição genética entre e dentro de populações naturais poderão assegurar que as medidas de conservação sejam adequadas (FRANKEL; SOULÉ, 1981). A EGE nas populações naturais geralmente é resultado de diferentes fatores tais como dispersão limitada de sementes e pólen, competição intra e interespecífica, deriva genética, seleção e endogamia (HARDY et al., 2006; LOVELESS; HAMRICK 1984; EPPERSON, 1992). Por meio das técnicas moleculares pode-se distinguir a estrutura genética inter e intra populacionais, permitindo visualizar os padrões do fluxo gênico e dispersão (CAVERS et al., 2005). Nesse aspecto, os marcadores moleculares têm se mostrado fundamentais na determinação da estrutura genética espacial, para caracterizar populações naturais de plantas, estimar diversidade gênica, endogamia, fluxo gênico, grau de parentesco (VIEIRA; CARVALHO, 2008; GONÇALVES et al., 2010), além de sua utilidade nos estudos de melhoramento vegetal (SEBBENN et al., 2001; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Dentre os marcadores moleculares, os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) apresentam características que favorecem seu uso, tais como manipulação facilitada, geram polimorfismos significativos, resultados em curtos espaços de tempo e ainda baixos custos quando comparados a outros marcadores (LIU; WENDEL, 2001; BRANDÃO et al., 2015; CHAGAS et al., 2015). Estudos têm sido feitos para avaliar a EGE de populações vegetais utilizando marcadores ISSR (CHUNG et al., 2006; MELO JÚNIOR et al., 2015).

Apesar de ainda serem poucos os estudos que tratam sobre os dispersores de frutos e pólen da *Copernicia prunifera*, o marimbondo caboclo (*Polistes canadensis* Linnaeus) e o irapuá (*Trigona spinipes* Fabricius) são apontados como seus principais polinizadores, enquanto que o morcego e o sanhaçu-do-coqueiro (*Tangara palmarum*) são indicados

como os principais dispersores de sementes (SILVA, R. A. R., dados não publicados; SOUSA, R. F., dados não publicados). Porém, a eficiência desses agentes dispersores para *C. prunifera* ainda não está bem estabelecida e, além disso, a espécie está submetida à antropização das populações naturais. Com isso, possivelmente há diferenças de magnitude da EGE entre diferentes estágios de vida (NG; LEE; KOH, 2004; VIEIRA et al., 2012). Logo, espera-se uma maior estruturação no estágio de vida jovem do que entre os adultos, uma vez que grandes quantidades de frutos se encontram dispersos próximo aos indivíduos parentais, como ocorre geralmente nas espécies tropicais (DEFAVARI et al., 2009; CONDIT et al., 2000). O processo de antropização além de contribuir diretamente para a redução da população, pode também afetar os dispersores e polinizadores, o que conseqüentemente poderá influenciar na diversidade e estrutura genética da população.

Assim, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar o padrão de distribuição e a estrutura genética espacial em diferentes estágios de desenvolvimento de indivíduos de *Copernicia prunifera* em uma população natural.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Espécie do estudo**

A *Copernicia prunifera* (Arecaceae), popularmente conhecida como carnaúba, apresenta caule revestido pelos remanescentes de folhas caídas, com altura entre 10 e 15 m, diâmetro entre 15 e 25 cm e folhas numerosas dispostas em leque (LORENZI, 2004). Seu fruto apresenta forma arredondada, mede em torno de dois centímetros de comprimento e possui epicarpo carnoso que reveste a semente. Apresenta cor esverdeada e sabor travoso quando imaturo e coloração roxo-escura ou quase preta e sabor adocicado quando maduro. Seu crescimento ocorre de forma lenta e a propagação se dá por meio da dispersão de sementes (BRAGA, 2001).

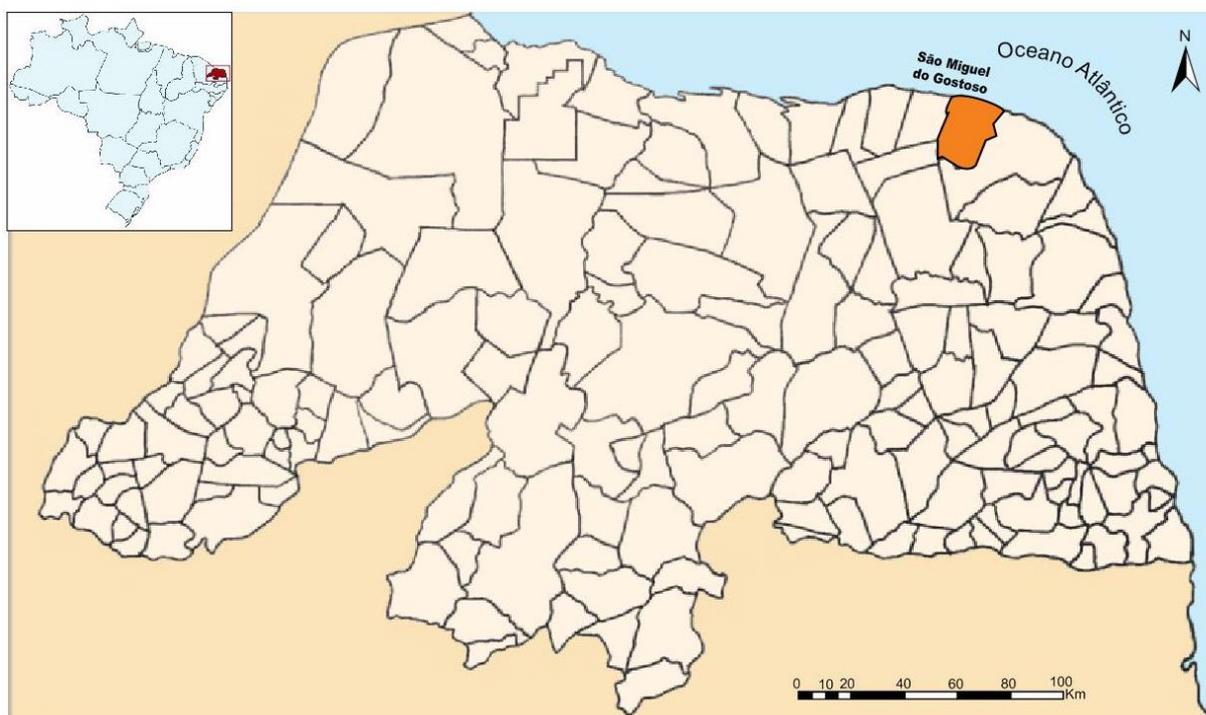
A espécie é nativa do nordeste do Brasil, presente nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte e Maranhão, Bahia, Alagoas e Sergipe, principalmente em terrenos de várzea e vales de rios que formam planícies inundáveis (LORENZI, 2004; ARRUDA; CALBO, 2004).

Além de possuir potencial paisagístico, a espécie é fonte de matéria prima nos variados setores da indústria e comércio (ARRUDA; CALBO, 2004). Suas folhas são utilizadas como alimentação animal e matéria prima para produtos artesanais, porém seu

principal produto é a cera retirada das folhas que é utilizada para diversos fins, como a produção de componentes eletrônicos, cápsulas de remédios, produtos alimentícios e ceras polidoras (CAVALCANTE; DINIZ, 2005; SILVA et al., 2009). Devido aos diversos usos econômicos a carnaúba é conhecida como “Árvore da Vida” (GOMES et al., 2009).

### Área de estudo

O estudo foi realizado em uma área localizada no município de São Miguel do Gostoso, no Estado do Rio Grande do Norte (Figura 1), com distância aproximada de 110 km da capital Natal (IBGE, 2012). O município que está inserido na microrregião do Litoral Nordeste (IDEMA, 2010) apresenta clima tropical com estação seca (As) conforme a classificação climática de Köppen-Geiger, e solo do tipo Areias Quartzosas Distróficas (IDEMA, 2010).



**Figura 1:** Localização geográfica do município de São Miguel do Gostoso, RN.

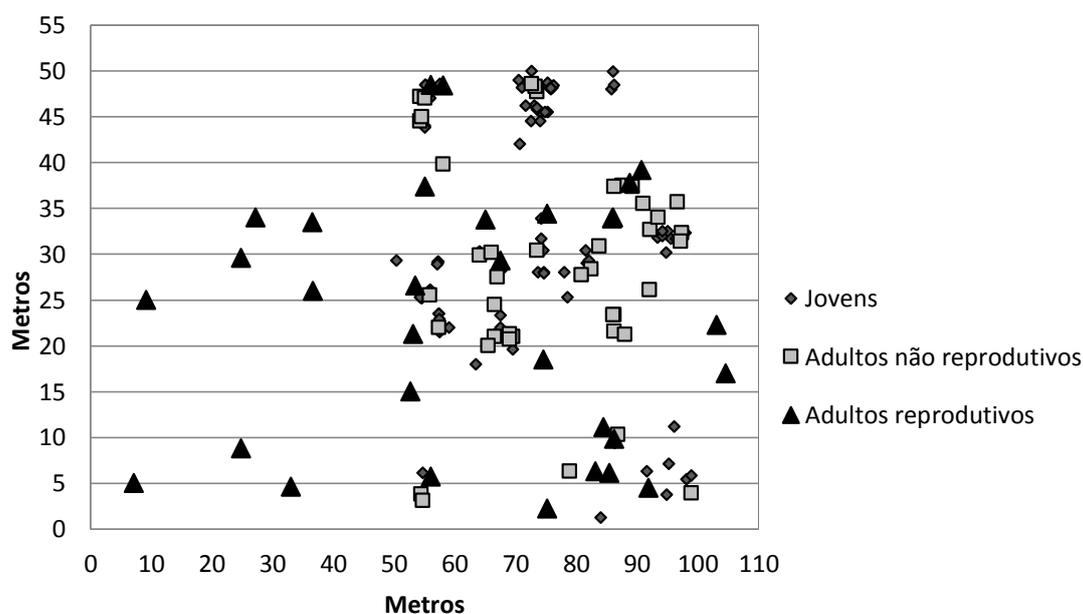
**Fonte:** Adaptado de <http://www.lookingformaps.com>

Foi observado na área de estudo a presença de marcas de pisoteio, e ainda o corte de árvores, provavelmente para retirada de lenha, o que pode indicar a ocorrência de um processo de antropização. Soma-se isso ao fato de haver a construção de uma usina eólica próximo a área onde está localizada a população. Porém é provável que o fator de maior

impacto para a população estudada seja o extrativismo da *C. prunifera*, que devido aos seus diversos usos na indústria e comércio culmina na exploração, muitas vezes de maneira predatória, provocando o decréscimo populacional.

### Amostragem

Foram amostrados todos os indivíduos de três estágios de desenvolvimento (jovem, adulto não reprodutivo e adulto reprodutivo) de *C. prunifera* em uma parcela demarcada medindo 50 m (Leste-Oeste) x 110 m (Norte-Sul) nas coordenadas 5° 07' 18" S e 35° 41' 02" W, dos quais foram registradas as posições geográficas (x e y) com o auxílio de fita métrica (Figura 2).



**Figura 2:** Distribuição espacial dos indivíduos de *C. prunifera* em uma população natural no município de São Miguel do Gostoso, Estado do RN, Brasil.

Com base na estatística descritiva referente à altura, foram consideradas plantas jovens os indivíduos de *C. prunifera* com até 1,7 m de altura, enquanto as duas outras classes foram organizadas de acordo com a ocorrência ou não de eventos reprodutivos (floração e frutificação) na época da avaliação, além da altura média que foi de 3,6 m para os adultos não reprodutivos e 5,85 para os adultos reprodutivos (Tabela 1).

Amostras foliares dos indivíduos foram coletadas em microtubos identificados contendo 1 mL do tampão de extração CTAB 2x (*Cationic hexadecyl trimethylammonium bromide*) e, em seguida transportadas ao Laboratório de Genética e Melhoramento Florestal da UFRN, onde foram armazenadas em freezer a -20 °C.

## **Extração e quantificação de DNA**

A extração do DNA foi feita com base no método CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987). A concentração de DNA total foi realizada utilizando espectrofotômetro. Em seguida, o DNA quantificado foi diluído de forma que todas as amostras tivessem a mesma concentração ( $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ). Após a diluição o DNA foi mantido em freezer a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento do uso.

## **Reação em cadeia da polimerase e eletroforese**

A amplificação dos fragmentos de DNA foi feita através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando termociclador Veriti, com 96 poços. O mix de PCR foi constituído por pré-mix IC PHT na concentração 1X contendo tampão IC (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,4 e 0,1 TritonX-100,  $\text{MgCl}_2$  2,0 mM), nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e enzima termoestável Taq DNA Polimerase – Taq PHT (recombinante), primer, DNA e água ultrapura. O ciclo da PCR consistiu em desnaturação prévia a  $94^\circ\text{C}$  por 2 minutos, seguida de 37 ciclos a  $94^\circ\text{C}$  por 15 segundos,  $47^\circ\text{C}$  por 30 segundos e  $72^\circ\text{C}$  por 1 minuto. O processo foi finalizado a  $72^\circ\text{C}$  por 7 minutos e resfriamento a  $4^\circ\text{C}$ .

Os produtos resultantes da PCR foram corados com GelRed<sup>TM</sup> e submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), em cuba horizontal, em tampão TAE 1,0 X (Tris-Acetato EDTA) e marcador de peso molecular (Ladder) de 10.000 pares de bases. O tempo total da reação de eletroforese foi de duas horas e meia com voltagem de 100 V. Após a eletroforese o gel de agarose foi retirado da cuba e fotografados com o auxílio do equipamento E-Box VX2, sobre luz ultravioleta.

## **Análise de dados**

### **Padrão espacial**

As análises foram realizadas por meio do programa SpPack 1.38, utilizando a função univariada de segunda ordem da densidade de vizinhos ou NDF (Neighbourhood Density Function) (CONDIT et al., 2000) para determinar o padrão de distribuição espacial da espécie, incluindo todos os indivíduos, bem como para cada estágio de desenvolvimento.

Foram feitas simulações por meio de classes de distância (t) entre 1 e 110 m, com intervalos de 10 m para a população total e adultos reprodutivos, e 5 m para os indivíduos

jovens e adultos não reprodutivos para evitar a ocorrência o efeito de *jagged plot* ou padrão denteado (WIEGAND; MOLONEY, 2004). Foi calculada, ainda, a correção do efeito de borda, conforme Goreaud e Pelissier (1999). Utilizando-se os valores obtidos na estatística NDF (t) foram construídos correlogramas em função da distância t e comparados a intervalos de confiança (superior e inferior), obtidos a partir de 499 simulações randômicas de Monte Carlo (alfa = 0,01).

Testaram-se três hipóteses estatísticas: 1) Completa aleatoriedade espacial (hipótese nula): valores de NDF dentro da faixa dos intervalos de confiança; 2) Padrão agregado (hipótese alternativa 1): valores de NDF acima do intervalo de confiança superior; 3) Padrão espacial segregado (hipótese alternativa 2): valores de NDF abaixo do intervalo de confiança inferior.

### **Diversidade genética e valor de PIC**

A variação genética dentro da população foi avaliada por meio do programa POPGENE versão 1.3 (YEH et al., 1997), através do qual foram calculados o número de alelos observados ( $N_a$ ), número de alelos efetivos ( $N_e$ ), diversidade genética de Nei ( $H_e$ ) e Índice de Shannon ( $I$ ), para cada estágio de desenvolvimento.

O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) foi calculado com a finalidade de testar a eficiência dos iniciadores utilizados em detectar o polimorfismo entre indivíduos, sendo a presença ou ausência de locos utilizadas como indicadores. Foi utilizada a fórmula proposta por Anderson et al. (1993), onde  $P_{ij}$  é a frequência do alelo "j" no marcador "i":

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

De acordo com Botstein et al. (1980), os marcadores são classificados como satisfatórios em conteúdo informativo quando o valor de PIC estiver acima de 0,500; mediamente informativo quando o valor variar entre 0,250 a 0,500 e pouco informativos se o valor encontrado estiver abaixo de 0,250.

### **Estrutura genética populacional**

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre os diferentes estágios de desenvolvimento foi realizada através do programa ARLEQUIN 3.1 (EXCOFFIER;

SMOUSE; QUATTRO, 1992). Por meio dessa análise estima-se a diferenciação da população a partir de dados moleculares e testes de hipóteses.

### **Estrutura genética espacial (EGE)**

Para a análise da EGE estimou-se o valor de coancestria entre pares de indivíduos para as diferentes classes de distância, para cada estágio de desenvolvimento e para todos os indivíduos da população (HARDY, 2003), utilizando-se o programa SPAGeDi 1.2g (HARDY; VEKEMANS, 2002). Já para a análise da intensidade da EGE nos diferentes estágios de desenvolvimento de *C. prunifera* foi calculada a estatística  $S_p$  por meio da fórmula  $S_p = -b_{log}/(1 - F_{ij(1)})$ , onde  $-b_{log}$  é a inclinação da curva de regressão do coeficiente de coancestria e  $F_{ij(1)}$  é a medida do coeficiente de coancestria da primeira classe de distância ( $F_{ij}$ ).

### **Detecção de gargalos genéticos**

A análise da ocorrência ou não de redução do tamanho efetivo populacional foi feita por meio do programa Bottleneck versão 1.2 (CORNUET; LUIKART, 1996), usando os modelos IAM (Modelo de Alelos Infinitos) e o SMM (Modelo de Passos de Mutação). Tais modelos foram utilizados para calcular a heterozigosidade esperada das populações em equilíbrio de mutação-deriva e compará-la com a heterozigosidade encontrada. Para locos ISSR o modelo de mutação é intermediário entre o IAM e o SMM, portanto os dois foram usados. Para indicar gargalos genéticos recentes significativos, foi utilizado o teste do sinal ( $\alpha = 0,05$ ) por meio da frequência dos alelos (CORNUET; LUIKART, 1996).

## **RESULTADOS**

### **Estrutura demográfica**

Dos 162 indivíduos amostrados, 88 foram classificados como jovens (com altura entre 0,1 e 1,7 m), 42 como adultos não reprodutivos (com altura superior a 1,7 e sem eventos reprodutivos) e 31 como adultos reprodutivos (Tabela 1).

**Tabela 1:** Caracterização ontogenética, com base na altura de plantas de *C. prunifera*.

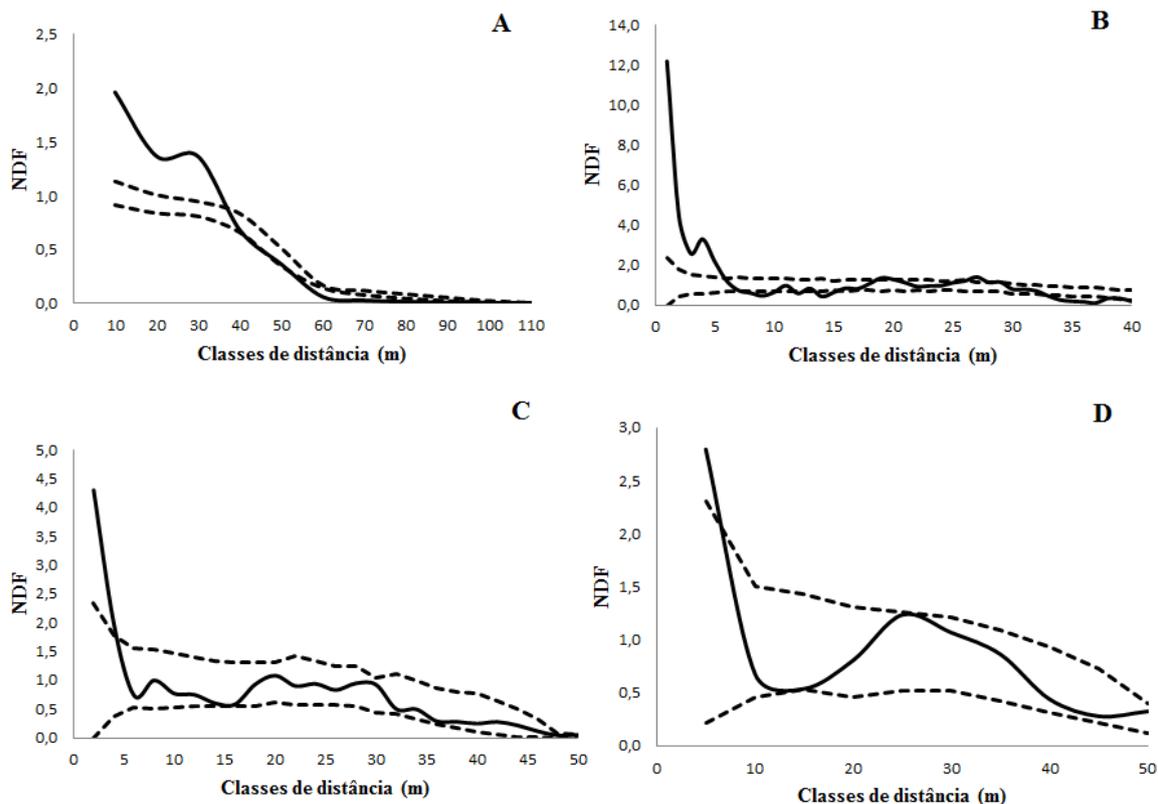
Classes	Número de indivíduos	Altura média (m) ± Desvio Padrão
Jovens	88	1,14 ± 0,41
Adultos não reprodutivos	42	3,60 ± 2,09
Adultos reprodutivos	31	5,85 ± 0,95
Total	161	2,69 ± 2,21

O padrão espacial de *C. prunifera*, considerando todos os indivíduos da população, mostrou a ocorrência de agregação nas classes de distância inferiores a 40 metros do indivíduo focal, indicando que a hipótese alternativa de agregação foi aceita. Nas distâncias entre 40 e 50 m o padrão espacial foi aleatório, aceitando-se a hipótese nula, já nas distâncias superiores a 50 m, observou-se padrão segregado, configurando a aceitação da hipótese alternativa de segregação (Figura 3 A).

Considerando-se o estágio dos indivíduos jovens, o padrão espacial mostrou agregação no raio de até 5 m de distância, principalmente entre os dois primeiros metros, sendo aceita, portanto a hipótese alternativa de agregação. Após 5 metros o padrão oscilou entre aleatório, agregado e segregado, porém com densidade inferior (Figura 3 B).

No estágio que compreendeu as plantas adultas não reprodutivas, verificou-se que até 4 metros de distância, a densidade de vizinhos foi maior que esperado, o que demonstra padrão agregado de distribuição, dessa forma a hipótese de agregação foi aceita, enquanto que a partir de 5 m de distância o padrão foi aleatório, ou seja, dentro do esperado, sendo aceita a hipótese nula de aleatoriedade (Figura 3 C).

Entre os indivíduos adultos reprodutivos, na distância de até 5 metros, o padrão espacial verificado foi agregado e após essa distância, passa a ser aleatório, aceitando-se as hipóteses alternativas de agregação e nula de aleatoriedade, respectivamente (Figura 3 D).



**Figura 3:** Padrão espacial obtido por meio da análise univariada da densidade de vizinhos (NDF) de indivíduos de *C. prunifera*; as linhas pontilhadas correspondem ao intervalo de confiança superior e inferior de: todos os estágios de desenvolvimento (A), jovens (B), não reprodutivos (C) e reprodutivos (D).

### Diversidade genética e valor de PIC

Foram utilizados oito iniciadores que geraram o total de 102 locos, 100 destes polimórficos (98,04 %). Houve variação entre 10 e 17 bandas, com média de 12,75 locos por iniciador. Os iniciadores UBC 825, UBC 840 e UBC 873 foram os que apresentaram maior número de locos. Os valores de PIC calculados para cada iniciador variaram entre 0,455 a 0,500 (Tabela 2).

**Tabela 2:** Sequência de nucleotídeos dos iniciadores ISSR, média de número de locos e valor de PIC de cada iniciador.

Iniciador ISSR	Sequencia (5' – 3')	Número de Locos	PIC
UBC 825 (AC)8-T	ACA CAC ACA CAC ACA CT	17	0,477
UBC 827 (AC)8-G	ACA CAC ACA CAC ACA CG	10	0,455
UBC 840 (GA)8-YT	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	14	0,499
UBC 851 (GT)8-YG	GTG TGT GTG TGT GTG TYG	12	0,469
UBC 857 (AC)8-YG	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	12	0,500
UBC 859 (TG)8-RC	TGT GTG TGT GTG TGT GRC	13	0,497
UBC 860 (TG)8-RA	TGT GTG TGT GTG TGT GRA	10	0,489
UBC 873 (GACA)4	GAC AGA CAG ACA GAC A	14	0,485
Média		12,75	0,484

*R = purina (A ou G) e Y = pirimidina (C ou T).*

Para a população total, o número de alelos observados foi 1,98 e de alelos efetivos 1,65. Já a diversidade genética de Nei (1973) de 0,37 e o índice de Shannon de 0,54 (Tabela 3).

**Tabela 3:** Medidas de diversidade genética para diferentes estágios de desenvolvimento.

Classes	n	Locos polimórficos/%	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>He</i>	<i>I</i>
Jovens	88	99/97,06 %	1,971±0,018	1,657±0,033	0,369±0,015	0,541± 0,019
Adultos não reprodutivos	42	93/91,18 %	1,912± 0,043	1,626± 0,051	0,353± 0,024	0,517± 0,032
Adultos reprodutivos	31	96/94,12 %	1,941± 0,042	1,591± 0,058	0,341± 0,027	0,505± 0,036
Total	161	100/98,04 %	1,980±0,0109	1,654±0,0244	0,370±0,0110	0,543±0,0139

*Na* = número de alelos observados, *Ne* = número de alelos efetivos, *He* = índice de diversidade genética de Nei, *I* = índice de Shannon. Os valores representam a média ± erro padrão.

Entre os três estágios, o que apresentou a maior porcentagem de locos polimórficos foi o de indivíduos jovens (97,06%). Já a menor porcentagem de locos polimórficos foi observada nos adultos não reprodutivos (91,18%). O número de alelos observados (*Na*) e alelos efetivos (*Ne*) também foi maior para os jovens, com valores de 1,97 e 1,66, respectivamente. O estágio de indivíduos jovens apresentou ainda o maior índice de diversidade genética com 0,37 (*He*) (Tabela 3).

O menor índice de diversidade genética foi apresentado pelos adultos reprodutivos com 0,34 (*He*), enquanto que o estágio que apresentou maior variabilidade genética foi o

composto por indivíduos jovens, com o valor de 0,54 (*I*). Já o estágio de indivíduos adultos reprodutivos foi o de menor variabilidade, com 0,50 (*I*) (Tabela 3).

### Estrutura genética

Os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) mostram a ocorrência de maior diversidade genética dentro dos estágios de desenvolvimento (98,61%) do que entre os estágios (1,39%) (Tabela 4).

**Tabela 4:** Análise da Variância Molecular (AMOVA) da população total e entre os estágios de desenvolvimento de *Copernicia prunifera*.

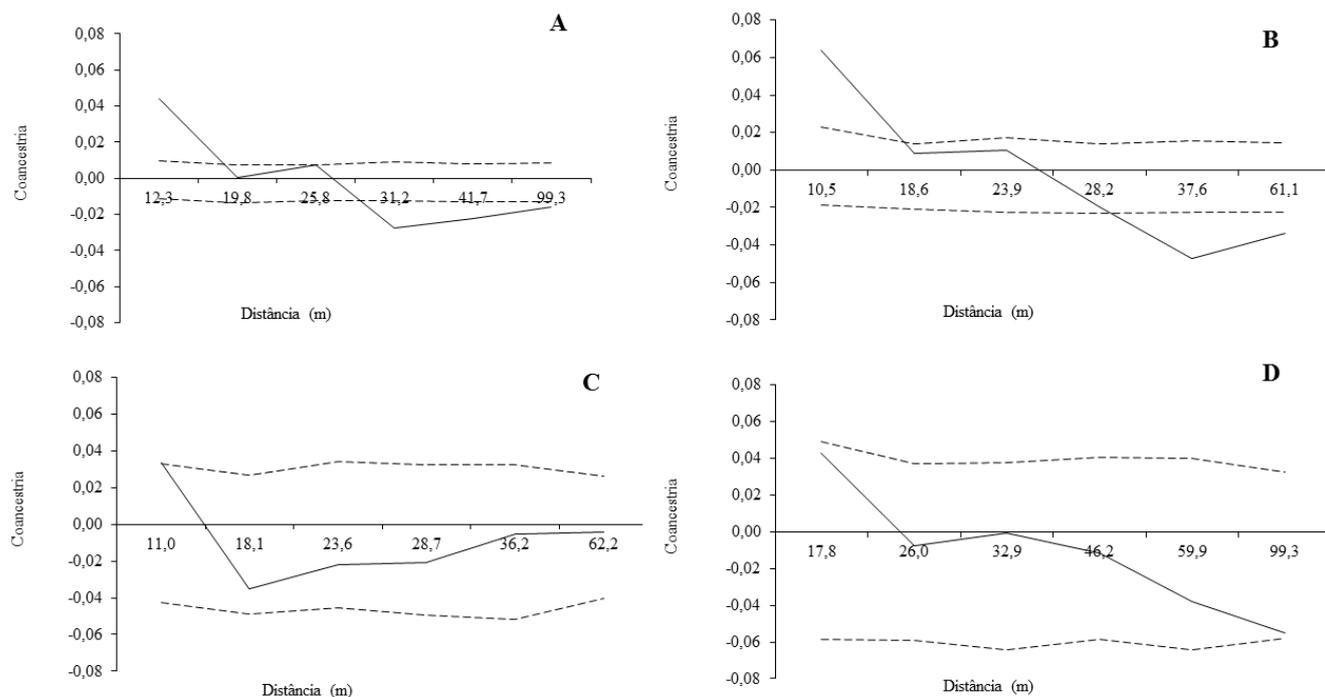
Fonte de variação	GL	SQ	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre estágios de desenvolvimento	02	12,852	0,05404	1,39
Dentro dos estágios de desenvolvimento	158	605,570	3,83272	98,61
Total	160	618,422	3,88677	
Índice de fixação Fst:	0,01390			

GL: grau de liberdade, SQ: soma dos quadrados dos desvios.

### Estrutura genética espacial

A população total ( $n = 161$ ) apresentou relação positiva e significativa de parentesco na primeira classe de distância (12,3 m) (Figura 4 A). Os jovens apresentaram parentesco significativo até 10,5 m e negativa na quinta classe de distância (37,6 m) e em diante (Figura 4 B).

Os adultos não reprodutivos tiveram relação positiva de parentesco na primeira classe de distância (11,0 m) e distribuição aleatória dos genótipos nas demais classes (Figura 4 C). Os adultos reprodutivos apresentaram genótipos distribuídos espacialmente de maneira aleatória (Figura 4 D).



**Figura 4:** Correlogramas do coeficiente de coancestria da população total (A), Jovens (B), Adultos não reprodutivos (C) e Adultos reprodutivos (D) de *Copernicia prunifera*. - - - Intervalo de confiança; — Valor de coancestria.

Os resultados da estatística  $S_p$  indicaram a ocorrência de estruturação genética na população total e nos estágios de desenvolvimento jovens e adultos reprodutivos ( $P < 0,05$ ), enquanto que no estágio adultos não reprodutivos não foi observada estruturação ( $P > 0,05$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5:** Caracterização da estrutura genética espacial de *Copernicia prunifera* na população total e nos estágios de desenvolvimento, sendo  $n$  o número de indivíduos amostrados,  $F_{ij}$  o coeficiente de coancestria para a primeira classe de distância,  $B_{log}$  a inclinação da curva de regressão do coeficiente de coancestria, a estatística  $S_p$ ,  $SE$  o erro padrão e  $P$  o valor de significância.

	$n$	$F_{ij}$	$B_{log}$	$S_p$	$SE$	$P$
Jovens	88	0,064	-0,046	0,046	0,005	0,000
Adultos não reprodutivos	42	0,034	-0,016	0,016	0,007	0,143
Adultos reprodutivos	31	0,043	-0,039	0,039	0,006	0,017
Total	161	0,044	-0,034	0,034	0,003	0,000

## Gargalos genéticos

O número de locos com excesso de heterozigosidade observado foi maior que o esperado e significativo pelo teste do sinal ( $P < 0,0001$ ), tanto no modelo IAM quanto SMM (Tabela 6).

**Tabela 6:** Testes de equilíbrio entre mutação e deriva genética para a população de *Copernicia prunifera* utilizando os modelos IAM e SMM.

Modelos	n	He	P
IAM	39,28	92,0	0,00000*
SMM	45,26	87,0	0,00000*

n = número esperado de locos com excesso de heterozigosidade em seu respectivo modelo; He = número de locos com excesso de heterozigosidade; P = probabilidade; \* = significativo a 5% de probabilidade.

## DISCUSSÃO

### Estrutura demográfica

O maior número de indivíduos nos estágios iniciais de desenvolvimento pode indicar a existência de estratégias utilizadas para a sobrevivência da espécie. Da mesma forma, o menor número nos estágios finais pode ter influência de fatores bióticos e abióticos, como por exemplo o tipo de dispersão de sementes, a competição e o tipo de solo (BUDKE et al., 2005). Resultados semelhantes foram encontrados por Alves et al. (2011) em um estudo com *Syagrus pseudococos* (Raddi) Glassman (Arecaceae) no qual verificaram a ocorrência de padrão espacial agregado, principalmente nas classes iniciais. González-M., Parrado-Rosselli e López-Camacho (2012) em estudo realizado em uma população da palmeira *Iriarteia deltoidea* Ruiz & Pav. também encontraram maior número de indivíduos nos primeiros estágios de desenvolvimento, sendo essa densidade reduzida com o aumento da idade, o que seria típico de populações naturais de plantas tropicais.

A presença de adultos sem a ocorrência de indivíduos jovens nas proximidades provavelmente está relacionada a atividades antrópicas no local, o que pode favorecer a compactação do solo e impedir o estabelecimento de plântulas. Já a presença de indivíduos jovens e adultos não reprodutivos sem que haja adultos reprodutivos nas

imediações pode estar ligado a não ocorrência de eventos reprodutivos na época de coleta, ou ainda, pela retirada da planta mãe do local.

No presente estudo, o padrão de distribuição espacial agregado que predominou nas primeiras classes de distância pode estar relacionado à dispersão restrita de sementes próxima as plantas-mães, que favorece esse tipo de distribuição. Resultados semelhantes foram relatados por Silva et al. (2014) em um estudo com *Copernicia prunifera* realizado no município de Lagoa de Pedras/RN, no qual sugerem que o padrão de distribuição agregado nas primeiras classes de distância está relacionado a dispersão restrita ao redor do parental. Vieira et al. (2010) trabalhando com *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae) verificaram que a distribuição agregada nas classes iniciais provavelmente relaciona-se com a dispersão de sementes próxima a planta-mãe.

A oscilação entre os padrões agregado, aleatório e segregado, principalmente entre os indivíduos jovens pode estar relacionado ao fato de que as palmeiras, muitas vezes, apresentam distribuição espacial heterogênea devido a alterações ambientais, como o aumento da exploração (ARRUDA; CALBO, 2004) e também por influência de agentes dispersores (FRAGOSO; SILVIUS; CORREA, 2003).

### **Diversidade genética e PIC**

A alta porcentagem de locos polimórficos encontrada demonstra a eficiência do marcador ISSR na verificação da diversidade genética dentro de populações naturais de *C. prunifera*. Rossi et al. (2014) também conseguiram alto polimorfismo (78,3%) em populações naturais de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) utilizando marcadores ISSR, porém este foi menor do que o encontrado no presente estudo.

A diversidade genética observada entre estágios de desenvolvimento e entre os indivíduos pode estar relacionada a perturbações do ambiente, dispersão restrita de sementes e baixa densidade de indivíduos reprodutivos (VIEIRA et al. 2012). O menor índice de variabilidade genética apresentada pelos indivíduos adultos reprodutivos e não reprodutivos de *C. prunifera* pode estar relacionado ao processo de antropização da área e conseqüentemente modificação do ambiente (GONÇALVES et al. 2010), que pode ser evidenciado pelo teste de gargalo genético (Tabela 6).

O decréscimo no tamanho efetivo populacional contribui na diminuição do fluxo gênico, redução do número de alelos e da heterozigosidade, favorecendo a redução da diversidade dentro das populações (DEFAVARI et al., 2009). Dessa forma, os índices de

diversidade encontram-se relacionados com o estágio de conservação e a estrutura demográfica da população.

Em um estudo realizado com uma população de *Euterpe edulis* utilizando aloenzimas, Conte et al. (2003) observaram a variabilidade genética dos estágios de desenvolvimento e constataram a não ocorrência de diferenças significativas nos índices de diversidade genética entre os estágios analisados. Os autores sugerem que tal fato pode estar relacionado a grande quantidade de indivíduos do estágio adulto, o que reduziria a deriva genética.

De acordo com a classificação de eficiência dos marcadores moleculares descrita por Botstein et al. (1980), todos os iniciadores utilizados no presente estudo foram considerados mediantemente informativos uma vez que apresentaram valores de PIC variando entre 0,455 a 0,500. Em uma pesquisa com *Euterpe oleracea* Mart. (Arecaceae) utilizando marcadores microssatélites, Oliveira et al. (2010) obtiveram valores de PIC que variaram entre 0,60 e 0,86, superando, portanto, os iniciadores utilizados no presente estudo. Brandão et al. (2015) em um estudo com *Myrcia splendens* (SW.) DC. (Myrtaceae), utilizando marcadores ISSR, encontraram valores de PIC entre 0,305 e 0,464, se aproximando, portanto, dos resultados encontrados neste estudo.

### **Estrutura genética**

A maior diversidade genética dentro dos estágios do que entre os estágios de desenvolvimento encontrada no presente estudo pode ser explicada, principalmente pela mutação, seleção natural e artificial (ação antrópica), deriva, dentre outros mecanismos que favorecem a alteração na estrutura genética e afetam os padrões de reprodução em plantas (ECKERT et al., 2009; LOWE et al., 2005; GAIOTTO; GRATTAPAGLIA; VENCOVSKY, 2003).

Dessa forma, a constituição genotípica da população analisada pode estar relacionada a exploração da espécie ocorrida na área que interfere na base genética e mecanismos ligados a estrutura genética. Resultados semelhantes foram descritos por Conte et al. (2003) em estudo com uma população de *Euterpe edulis*, no qual sugerem que a exploração da espécie influencia o genótipo da população no local de estudo.

### **Estrutura genética espacial**

A relação positiva e significativa de parentesco encontrada na primeira classe de distância da população total (12,3 m) se assemelha aos resultados encontrados por Vieira et al. (2010) em estudo com a palmeira *E. edulis*, onde verificaram a ocorrência de coancestria positiva até 15 m, o que indica o aumento da estrutura genética entre indivíduos mais próximos. Choo, Juenger e Simpson (2012) em uma pesquisa com a palmeira *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng. também encontraram relação positiva de parentesco nas primeiras classes de distância nos diferentes estágios de desenvolvimento estudados. Os autores sugerem que a EGE significativa encontrada está relacionada a dispersão das sementes a curtas distâncias.

Em um estudo com *Myrcia splendens* (SW.) DC. (Myrtaceae) em fragmentos e corredores de vegetação utilizando iniciadores ISSR, Brandão, Vieira e Carvalho (2011) verificaram a ocorrência de coancestria positiva em dois corredores, nas distâncias de 27 (P=0,029) e 70 metros (P=0,009), de acordo com os resultados da estatística *Sp*.

Silva, Vieira e Carvalho (2011) em um estudo com duas populações de *Geonoma schottiana* Mart (Arecaceae) utilizando isoenzimas verificaram ausência de estruturação genética em uma das populações, enquanto que na outra a estruturação foi considerada fraca e não significativa com valor de *Sp* igual a 0,006.

Assim, os resultados da EGE encontrados no presente estudo podem estar relacionados tanto à dispersão restrita da espécie (SILVA et al., 2014) quanto a perturbações antrópicas no local. Tais fatores tendem a reduzir o tamanho populacional e conseqüentemente aumentar as taxas de autofecundação e cruzamentos entre indivíduos aparentados, podendo provocar a perda da capacidade reprodutiva ao longo das gerações (GONÇALVES et al., 2010).

### **Gargalos genéticos**

Os resultados encontrados nos testes de gargalos genéticos podem ser explicados pela redução de genótipos provocados pela antropização da área. Como estratégia de manejo, tais resultados poderão gerar subsídios para a conservação genética da espécie em comunidades extrativistas. Chagas et al. (2015) sugeriram que a redução do tamanho populacional de *Elaeis guineenses* Jacq. (Arecaceae), utilizando marcadores ISSR, seria decorrente de perda de habitats e atividades agrícolas desenvolvidas no local.

A aleatoriedade demográfica encontrada nas distâncias superiores de *C. prunifera* pode estar relacionada à exploração da espécie, que é amplamente utilizada por

extrativistas e apresenta múltiplos usos na indústria e comércio (ARRUDA; CALBO, 2004). A intensa exploração extrativista observada na área de estudo, principalmente para a retirada das folhas, traz como consequência o decréscimo populacional e a fragmentação, o que traz como consequência a redução da diversidade genética.

## CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO

O padrão de distribuição espacial apresentado pelos indivíduos de *Copernicia prunifera* foi do tipo agregado com maior densidade de vizinhos nas primeiras classes de distância. Além disso, verificou-se uma relação positiva e significativa de parentesco na primeira classe de distância da população total. Dentre os estágios de desenvolvimento, a maior variabilidade genética foi apresentada pelo estágio composto por indivíduos jovens. Observou-se ainda uma maior diversidade genética dentro dos estágios do que entre os estágios de desenvolvimento. Além do fator biótico (dispersão restrita das sementes) o extrativismo da *C. prunifera* possivelmente determina o padrão genético espacial encontrado.

A redução da vegetação nativa e a fragmentação de habitats representam uma grande ameaça a biodiversidade, favorecendo a perda da variabilidade genética nas populações vegetais (MYERS et al., 2000; KAGEYAMA; GANDARA; SOUZA, 1998). Informações geradas por estudos de genética de populações são importantes na elaboração de programas de melhoramento e conservação de espécies, auxiliando na definição de áreas prioritárias para conservação e manejo dos recursos (KAGEYAMA; GANDARA; SOUZA, 1998; STEFENON; NODARI; REIS, 2003).

Apesar de não estar incluída na lista de espécies ameaçadas de extinção, atividades agrícolas e extrativistas têm provocado a redução das populações naturais de *Copernicia prunifera* em suas áreas de ocorrência (REIS et al., 2011), como pode ser verificado na área de estudo onde observou-se o corte de indivíduos e a construção de um parque eólico nas proximidades. Tais fatores possivelmente afetam diretamente a redução populacional, além de influenciar a polinização e dispersão de frutos.

Assim, novos estudos devem ser realizados em diferentes populações de *C. prunifera*. Estes deverão descrever a biologia reprodutiva e a dispersão de pólen e sementes, uma vez que tais fatores apresentam influência na estrutura genética e diversidade da espécie.

No presente estudo observou-se a ocorrência de estruturação genética entre indivíduos espacialmente mais próximos, que pode estar relacionada à dispersão restrita ou a antropização do local. Tais fatores podem afetar os padrões de reprodução da espécie, levando ao cruzamento entre indivíduos aparentados e ainda provocar a perda da capacidade reprodutiva. Dessa forma, verifica-se a necessidade da conservação das populações naturais de *C. prunifera* para que a sua variabilidade genética não desapareça ao longo das gerações.

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais da UFRN (PPGCFL/UFRN) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, I.; FISCH, S. T. V.; MENDONÇA, C. B. G.; MONTEIRO, E. A. Distribuição e padrão espacial da Palmeira *Syagrus pseudococos* (Raddi) Glassman (Arecaceae), em um trecho de encosta na Serra do Mar, Ubatuba-SP, Brasil. **Revista de Biociências da Universidade de Taubaté**, Vol.17, nº 2, p. 52-59, 2011.
- ARRUDA, G. M. T.; CALBO, M. E. R. Efeitos da inundação no crescimento, trocas gasosas e porosidade radicular da carnaúba (*Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore). **Acta Bot. Bras.**, Brasília, v. 18, n. 2, p.219-224, 2004.
- BORCARD, D.; LEGENDRE, P.; DRAPEAU, P. Partialling out the spatial component of ecological variation. **Ecology**, v. 73, n.3, p. 1045-1055, 1992.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste Especialmente do Ceará**. Fundação Guimarães Duque. Coleção Mossoroense, Série C. v.1204, 2001.
- BRANDÃO, M. M.; VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Estrutura genética em microescala espacial de *Myrcia splendens* (Myrtaceae). **Revista Árvore**, v. 35, n. 5, p. 957-964, 2011.
- BRANDÃO, M. M.; VIEIRA, F. A.; NAZARENO, A. G.; CARVALHO, D. Genetic diversity of neotropical tree *Myrcia splendens* (Myrtaceae) in a fragment-corridor system in the Atlantic rainforest, **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 216, p.35–41, set. 2015.
- BUDKE, J. C.; ATHAYDE, E. A.; GIEHL, E. L. H.; ZÁCHIA, R. A.; EISINGER, S. M. Composição florística e estratégias de dispersão de espécies lenhosas em uma floresta ribeirinha, arroio Passo das Tropas, Santa Maria, RS, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, Porto Alegre, v. 60, n. 1, p. 17-24, jan.-jun., 2005.

- CAVALCANTE, C. R.; DINIZ, S. F. O estudo da carnaúba no ensino de geografia no município de Coreaú – CE. **Revista da Casa da Geografia de Sobral**, Sobral, v. 6/7, n.1, p. 141-150, 2005.
- CAVERS, S.; DEGEN, B.; CARON, H.; LEMES, M. R.; MARGIS, R.; SALGUEIRO, F.; LOWE, A. J. Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. **Heredity**, v. 95, p. 281-289, 2005.
- CHAGAS, K. P. T.; SOUSA, R. F.; FAJARDO, C. G.; VIEIRA, F. A. Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineenses*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 1, p. 147-152, 2015.
- CHOO, J.; JUENGER, T. E.; SIMPSON, B. B. Consequences of frugivore-mediated seed dispersal for the spatial and genetic structures of a neotropical palm. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 4, p. 1019–1031, 2012.
- CHUNG, J. M.; LEE, B. C.; KIM, J. S.; PARK, C-W.; CHUNG, M. Y.; CHUNG, M. G. Fine-scale genetic structure among genetic individuals of the clone-forming monotypic genus *Echinosophora koreensis* (Fabaceae). **Annals of Botany**, v.98, p.165–173, 2006.
- CONDIT, R.; ASHTON, P. S.; BAKER, P.; BUNYAVEJCHEWIN, S.; GUNATILLEKE, S.; GUNATILLEKE, N.; HUBBELL, S. P.; LOSOS, E.; MANOKARAN, N.; SUKUMAR, R.; YAMAKURA T. Spatial patterns in the distribution of tropical tree species. **Science**, v. 288, p. 1414-1418, 2000.
- CONTE, R.; NODARI, R. O.; VENCOVSKY, R.; REIS, M. S. Genetic diversity and recruitment of the tropical palm, *Euterpe edulis* Mart., in a natural population from the Brazilian Atlantic Forest. **Heredity**, v. 91, p. 401–406, 2003.
- CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, p. 2001-2014, 1996.
- DEFAVARI, G. R.; TARAZI, R.; MORENO, M. A.; FERRAZ, E. M.; GANDARA, F. B.; KAGEYAMA, P. Y. Estrutura genética espacial intrapopulacional de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne na Estação Ecológica de Itirapina, SP. **Scientia Forestalis**, v. 37, n. 81, p. 089-098, 2009.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1987.
- ECKERT, C. G.; KALISZ, S.; GEBER, M. A.; SARGENT, R.; ELLE, E.; CHEPTOU, P. O.; GOODWILLIE, C.; JOHNSTON, M. O.; KELLY, J. K.; MOELLER, D. A.; PORCHER, E.; REE R. H.; VALLEJO-MARÍN, M.; WINN, A. A. Plant mating system in a changing world. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v. 25, n.1, p.35-43, 2009.

EPPERSON, B. K. Spatial structure of genetic variation within populations of forest tree. *New Forests*, v. 6, p. 257-278, 1992.

EPPERSON, B. K.; ALVAREZ-BUYLLA, E. R. Limited seed dispersal and genetic structure in life stages of *Cecropia obtusifolia*. *Evolution*, v. 51, n. 1 p. 275–282, Fev. 1997.

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220p.

FRAGOSO, J. M. V.; SILVIUS, K. M.; CORREA, J. A. Long-distance seed dispersal by tapirs increases seed survival and aggregates tropical trees. *Ecology*, v.84, p. 1998-2006, 2003.

FRANKEL, O. H.; SOULÉ, M. E. **Conservation and evolution**. Cambridge, Cambridge University Press, 1981, 327p.

GAINO, A. P. S. C.; SILVA, A. M.; MORAES, M. A.; ALVES, P. F.; MORAES, M. L. T.; FREITAS, M. L. M.; SEBBENN, A. M. Understanding the effects of isolation on seed and pollen flow, spatial genetic structure and effective population size of the dioecious tropical tree species *Myracrodruon urundeuva*. *Conservation Genetics*, v. 11, n. 5, p. 1631-1643, 2010.

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

GOMES, J. A. F.; LEITE, E. R.; CAVALCANTE, A. C. R.; CÂNDIDO, M.J. D.; LEMPP, B.; BOMFIM, M. A. D.; ROGÉRIO, M. C. P. Resíduo agroindustrial da carnaúba como fonte de volumoso para a terminação de ovinos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 44, n. 1, p. 58-67, jan. 2009.

GONÇALVES, A. C.; REIS, C. A. F.; VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Estrutura genética espacial em populações naturais de *Dimorphandra mollis* (Fabaceae) na região norte de Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, V.33, n.2, p.325-332, abr.-jun. 2010.

GONZÁLEZ-M., R.; PARRADO-ROSSELLI, A.; LÓPEZ-CAMACHO, R. Estructura poblacional de la palma *Iriarteia deltoidea*, en un bosque de tierra firme de la amazonia colombiana. *Caldasia*, n. 34, v. 1, p. 187-204, 2012.

GOREAUD, F.; PÉLISSIER, R. On explicit formulas of edge effect correction for Ripley's K-function. *Journal of Vegetation Science*, v. 10, n. 3, p. 433-438, 1999.

HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology**, v.2, p. 618-620, 2002.

HARDY, O. Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterization of isolation-by-distance processes using dominant genetic markers. **Molecular Ecology**, v.12, p. 1577-1588, 2003.

HARDY, O. J.; MAGGIA, L.; BANDOU, E.; BREYNE, P.; CARON, J.; CHEVALLIER, M. H.; DOLIGEZ, A.; DUTECH, C.; KREMER, A.; LATOUCHE-HALLÉ, C.; TROISPOUX, V.; VERON, V.; DEGEN, B. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 neotropical tree species. **Molecular Ecology**, Oxford, v.15, p.559-571, 2006.

IBGE. **Anuário estatístico do Brasil**, Rio de Janeiro, v.72, p.1-458, 2012.

IDEMA. **Anuário Estatístico do Rio Grande do Norte**. Natal, v. 37, p. 1-348, 2010.

ITOH, A.; YAMAKURA, T.; OHKUBO, T.; KANZAKI, M.; PALMIOTTO, P.; TAN, S.; LEE, H. S. Spatially aggregated fruiting in an emergent Bornean tree. **Journal of Tropical Ecology**, v. 19, p. 531-538, 2003.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B.; SOUZA, L. M. I. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **SÉRIE TÉCNICA IPEF**, v. 12, n. 32, p. 65-70, 1998.

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

LORENZI, H. et al. **Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas**. Editora Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2004, 432 p.

LOWE, A. J.; BOSHIER, D.; WARD, M.; BACLES, C. F. E.; NAVARRO, C. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation, reconciling empirical evidence and predicted theory for Neotropical trees. **Heredity**, London, v. 95, n. 4, p. 255-273, 2005.

LIU, B.; WENDEL, J. F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, p. 205-208, 2001.

MELO JÚNIOR, A. F.; CARVALHO, D.; BRANDÃO, M. M.; SOUSA, L. G.; VIEIRA, F. A.; MENEZES, E. V.; ROYO, V. A.; OLIVEIRA, D. A. Spatial genetic structure of *Cavanillesia arborea* K. Schum. (Malvaceae) in seasonally dry Tropical forest: Implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.58, p. 114-119, 2015.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

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

NG, K. K. S.; LEE, S. L.; KOH, C. L. Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. **Molecular Ecology**, v.13, n.3, p.657-669, 2004.

OLIVEIRA, M. S. P.; SANTOS, J. B.; AMORIM, E. P.; FERREIRA, D. F. Variabilidade genética entre acessos de açazeiro utilizando marcadores microssatélites. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 5, p. 1253-1260, 2010.

REIS, R. G. E.; PEREIRA, M. S.; GONÇALVES, N. R.; PEREIRA, D. S.; BEZERRA, A. M. E. Emergência e qualidade de mudas de *Copernicia prunifera* em função da embebição das sementes e sombreamento. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 24, n. 4, p. 43-4, 2011.

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

SEBBENN, A. M.; SEOANE, C. E. S.; AMA, P. Y. K.; LACERDA, C. M. B. Estrutura genética em populações de *Tabebuia cassinoides*: implicações para o manejo florestal e a conservação genética. **Revista Instituto Florestal**, v. 13, n. 2. p. 99-113, dez. 2001.

SILVA, F. D. B.; MEDEIROS FILHO, S.; BEZERRA, A. M. E.; FREITAS, J. B. S.; ASSUNÇÃO, M. V. Pré-embebição e profundidade de semeadura na emergência de *Copernicia prunifera* (Miller) H. E Moore. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.40, n.2, p. 272-278. abr.-jun. 2009.

SILVA, M. S.; VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Diversity and genetic structure in natural populations of *Geonoma schottian* Mart (Arecaceae): implications for conservation. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 2, p. 195-201, abr.-jun. 2011.

SILVA, R. A. R.; SOUSA, R. F.; ARAÚJO, L. H. B.; PINHEIRO, L. G.; VIEIRA, F. A. Distribuição espacial em microescala da palmeira carnaúba, *Copernicia prunifera* (Mill) H. E. Moore. **Revista Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 10, n. 1, p. 118-121, jan - mar, 2014.

STEFENON, V. M.; NODARI, R. O.; REIS, M. S. Padronização de protocolo AFLP e sua capacidade informativa para análise da diversidade genética em *Araucaria angustifolia*. **Scientia Forestalis**, n. 64, p. 163-171, dez. 2003.

VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Genetic structure of an insect-pollinated and bird-dispersed tropical tree in vegetation fragments and corridors: implications for conservation. **Biodiversity and Conservation**, n. 17, p. 2305-2321, 2008.

VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D.; HIGUCHI, P.; MACHADO, E. L.; SANTOS, R. M. Spatial pattern and finescale genetic structure indicating recent colonization of the palm *Euterpe edulis* in a Brazilian Atlantic forest fragment. **Biochemical Genetics**, v. 48, p. 96-103, 2010.

VIEIRA, F. A.; FAJARDO, C. G.; SOUZA, A. M.; REIS, C. A. F.; CARVALHO, D. Fine-scale genetic dynamics of a dominant neotropical tree in the threatened Brazilian Atlantic Rainforest. **Tree Genetics & Genomes**, v. 8, p. 1191-1201, 2012.

WIEGAND, T.; MOLONEY K. A. Rings, circles, and null-models for point pattern analysis in ecology. **Oikos**, v. 104, p. 209-229, 2004.

YEH, F. C.; YANG, R. C.; BOYLE, T. B. J.; YE, Z. H.; MAO, J. X. **POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis molecular biology and biotechnology center**. Edmonton, 1997.