

Análise da diversidade genética de populações de palmitreiro (*Euterpe edulis* MARTIUS) através de marcadores isoenzimáticos

Maisa Pimentel Martins-Corder¹
Luis Eduardo Britto Fialho¹
Daisy Christiane Zambiasi¹
Enéas Ricardo Konzen¹

RESUMO

O palmitreiro (*Euterpe edulis* Martius) foi intensamente explorado na Mata Atlântica. Consequentemente, houve alterações na estrutura genética das populações. A diversidade genética de populações de palmitreiro foi analisada em diversas sub-populações, localizadas no Rio Grande do Sul. Plântulas foram analisadas pela técnica de eletroforese de isoenzimas em camada suporte de amido de milho (Penetrose 30, viscosidade 53973"), com base em 15 locos, representando os sistemas: á-esterase, Peroxidase, 6-Fosfogluconato desidrogenase, Fosfogluco mutase, Fosfogluco isomerase, Leucina aminopeptidase, Malato desidrogenase e Glutamato-oxaloacetato transaminase. As medidas de diversidade genética encontradas foram: heterozigosidade média observada ($H_o = 0,239$); porcentagem de locos polimórficos ($P = 68\%$); e número médio de alelos por loco ($A_p = 2,2$). O índice de fixação indicou ligeiro excesso de homozigotos nas populações ($F = 0,01$). Apesar de constantes perdas de indivíduos, as taxas de cruzamento foram elevadas ($t = 0,98$), provavelmente graças à existência de mecanismos de autoincompatibilidade pós-zigótica. A estimativa do fluxo gênico foi elevada ($N_m = 6$), indicando a ocorrência de trocas alélicas entre as subpopulações. A maior parte da variabilidade genética esteve distribuída dentro das populações, confirmando a tendência para espécies alógamas. A variabilidade genética das populações do Rio Grande do Sul figura entre as mais reduzidas, dentre as verificadas em outras regiões de ocorrência do país. A eliminação de populações e de indivíduos de palmitreiro levou à perda de alelos e, provavelmente, conduziu a espécie à erosão genética. Consequentemente, gerou um grave comprometimento para a adoção de estratégias de manejo, conservação e melhoramento do palmitreiro nessas populações.

Palavras-chave: fragmentação florestal, variabilidade genética, endogamia, isoenzimas.

ABSTRACT

Analysis of genetic diversity in populations of heart-of-palm (*Euterpe edulis* MARTIUS) using isoenzyme markers

Heart-of-palm (*Euterpe edulis* Martius) was intensively exploited in the Atlantic Forest. Consequently, there was a change in the genetic structure of populations. The genetic diversity of heart-of-palm populations was analyzed in several sub-populations in the State of Rio Grande do Sul. Seedlings were analyzed using isoenzymes with starch gel electrophoresis (Penetrose 30, viscosity 53973"), through 15 loci, representing the systems: á-Esterase, Peroxidase, 6-Phosphogluconate dehydrogenase, Phosphoglucomutase, Phosphoglucoisomerase, Leucine aminopeptidase, Malate

Recebido para publicação em março de 2008 e aprovado em março de 2009

¹ Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Ciências Florestais, Av. Roraima, n.º. 1000, 97105-900, Santa Maria, RS. maisapm@gmail.com, eneas_florestal@yahoo.com.br

dehydrogenase and Glutamate-oxaloacetate transaminase. The measures of genetic diversity found were: mean observed heterozygosity ($H_o = 0.239$); percentage of polymorphic loci ($P = 68\%$) and mean number of alleles per locus ($A_p = 2.2$). The fixation index indicated an excess of homozygotes in the populations ($F = 0.01$). In spite of the constant loss of individuals, the mating ratios were high ($t = 0.98$), probable due mechanisms of post-zygotic self-incompatibility. The estimate of gene flow was high ($N_m = 6$), indicating allele movement among populations. The greatest part of genetic variability was distributed within populations, confirming the tendency towards outcrossing species. The genetic variability found in the populations is among the most reduced in comparison with other populations of other regions in Brazil. The eradication of populations and individuals of heart-of-palm led to allele losses and probably led the species to genetic erosion. Consequently, it compromised the adoption of strategies of management, conservation and breeding of heart-of-palm in these populations.

Key words: Forest fragmentation, genetic variability, inbreeding, isoenzymes.

INTRODUÇÃO

O palmiteiro (*Euterpe edulis* Martius, Arecaceae) ocorre naturalmente ao longo das áreas de domínio da Floresta Tropical Atlântica, desde o sul da Bahia (15°S), até o Rio Grande do Sul (30°S). *E. edulis* também aparece em outros estados (Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais e Distrito Federal), no leste do Paraguai e no norte da Argentina (57° W) (Reis *et al.*, 2000; Carvalho, 2003). A espécie foi intensamente explorada nas suas áreas de ocorrência, pois constitui a principal fonte de produção de palmito, produto comestível formado pelo meristema apical da planta. Frequentemente, o palmito é comercializado na forma de conservas, apresentando ampla aceitação no mercado consumidor nacional e internacional (Galetti & Fernandez, 1998).

Nas fases iniciais do desenvolvimento, indivíduos de *E. edulis* crescem à sombra das espécies lenhosas e atingem altura superior a 20 m na fase adulta (Cardoso *et al.*, 2000). A espécie é monóica, apresenta inflorescências do tipo panícula e suas flores são unissexuais (Carvalho, 2003). As inflorescências apresentam acentuada protandria, pois a abertura das flores femininas ocorre em torno de sete dias depois do final da floração masculina (Mantovani & Morelato, 2000). Esse padrão de florescimento assegura a alogamia da espécie, o que tem sido evidenciado pelas taxas de cruzamentos próximas de 1,0, encontradas em diversos estudos genéticos com a espécie (Reis, 1996; Conte, 2004).

A estratégia de sobrevivência do palmiteiro dá-se pela formação de um banco de plântulas, em que há disponibilidade de vasto número de indivíduos. No entanto, a maioria não atinge a fase adulta (Reis *et al.*, 1996). A intensa exploração do palmito e a fragmentação de “habitats” comprometeram sua dinâmica ecológica e reduziram o tamanho das populações naturais. Isso levou à redução na

oferta de palmito e à imposição de restrições legais à retirada do produto da floresta. No entanto, os cortes clandestinos continuaram, por causa da falta de fiscalização e de incentivos para um adequado manejo da espécie (Galetti & Fernandez, 1998). Conseqüentemente, ocorreu a redução do número de indivíduos nas áreas de exploração, bem como a eliminação de populações inteiras, em casos extremos (Conte, 2004).

A fragmentação da Mata Atlântica transformou áreas contínuas em remanescentes pequenos e isolados. A extração contínua de recursos florestais contribuiu para agravar a fragmentação e destruição dos “habitats” (Lowe *et al.*, 2005). Conseqüentemente, ocorreu redução no tamanho efetivo e alterações no sistema genético das populações (Hamrick, 2004). A erosão genética e o aumento da divergência genética entre populações por meio de deriva genética, endogamia e redução do fluxo gênico são possíveis conseqüências, em populações que sofreram redução e isolamento (Young & Boyle, 2000).

Marcadores isoenzimáticos foram empregados eficientemente, para a obtenção da estimativa dos níveis de diversidade genética populacional: entendimento da estrutura genética e análise do fluxo gênico entre populações de palmito (Reis, 1996; Conte, 2001; Conte, 2004; Silva, 2004). Os marcadores isoenzimáticos apresentam ação gênica codominante, o que favorece a distinção entre homozigotos e heterozigotos. Assim, torna-se possível estimar parâmetros genéticos diretamente.

É extremamente importante elucidar a estrutura genética de populações naturais de palmito, para a adoção de estratégias de manejo sustentado, melhoramento genético e conservação. Por essa razão, o presente estudo teve por objetivo analisar a distribuição da variabilidade genética em populações de *E. edulis*, situadas em distintos fragmentos florestais, onde a espécie é nativa, no Estado do Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Populações amostradas e preparação das amostras

Duas populações de *E. edulis*, com diferentes níveis de perturbação antrópica, foram estudadas, sendo uma situada na Depressão Central (Floresta Estacional Decidual e Floresta Estacional Semidecidual) e, a outra, na Região Litorânea (Floresta Ombrófila Densa), no Rio Grande do Sul (Tabela 1). Na Depressão Central foram amostradas quatro subpopulações, situadas em fragmentos florestais nos municípios de Candelária, Santa Cruz do Sul e Venâncio Aires (Floresta Estacional Decidual), e Mariana Pimentel (Floresta Estacional Semidecidual). Na Região Litorânea foram avaliadas três subpopulações, localizadas em fragmentos florestais nos municípios de Caraá, Terra de Areia e Torres (Floresta Ombrófila Densa).

Nas análises eletroforéticas foram utilizadas folhas jovens de mudas de palmito, produzidas em viveiro a partir de sementes coletadas em dez progênies de cada uma das subpopulações. Foram amostradas 16 plântulas por progênie, 160 indivíduos por subpopulação, totalizando 1120 indivíduos, em sete subpopulações.

Na preparação dos extratos enzimáticos, partes de tecido do limbo foliar foram macerados em 100 μ l de solução extratora, elaborada conforme o descrito por Alfenas *et al.* (2006). Fragmentos de papel Whatman (3 mm) foram misturados com os estratos e refrigerados em pequenos tubos Eppendorf, em freezer a -18°C, por aproximadamente 15 dias.

Eletroforese e sistemas isoenzimáticos

Os procedimentos adotados foram propostos por Martins-Corder (1994). Na separação das isoenzimas foi utilizada a técnica de eletroforese de isoenzimas, em camada suporte de gel de amido de milho (Penetrose 30, viscosidade 53973"), a 13%. As condições de eletroforese e os sistemas-tampão empregados são apresentados na Tabela 2. Após a eletroforese, os géis foram seccionados em fatias, que foram

colocadas em bandejas de porcelana, contendo solução de revelação apropriada para cada isoenzima. Para cada indivíduo foram analisados oito sistemas isoenzimáticos, sendo α -Esterase (α -EST), Peroxidase (PRX), 6-Fosfogluconato desidrogenase (6-PGDH), Fosfogluco mutase (PGM), Fosfogluco isomerase (PGI), Leucina aminopeptidase (LAP), Malato desidrogenase (MDH) e Glutamato-oxaloacetato transaminase (AAT) (Tabela 2).

As interpretações foram realizadas por meio das estruturas quaternárias e dasegregação aparente das isoenzimas reveladas nos géis. Para cada sistema isoenzimático, a isoenzima mais anódica foi designada por loco 1 e a partir deste foram numerados os outros locos. A banda de maior mobilidade em cada loco foi denominada alelo A₁ e, a partir deste, foram identificados os outros alelos. Os padrões de bandas obtidos foram designados por genótipos e transformados em frequências alélicas.

Análises estatísticas

Foi utilizado o programa computacional POPGENE versão 1.31. (Yeh & Boyle, 1999) para a obtenção das frequências alélicas e dos índices de diversidade genética: o número médio de alelos por loco (A_p = número total de alelos por loco polimórfico/número de locos polimórficos) e a porcentagem de locos polimórficos (P = número de locos polimórficos/número total de locos). Para os valores de P adotou-se o critério de 95% de probabilidade, em que um loco é considerado polimórfico se a frequência do alelo mais comum não excede 95%. Os demais índices de diversidade genética obtidos foram a heterozigosidade média observada ($H_o = 1 - \sum p_{ij}^2$) e a heterozigosidade média esperada sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg [$H_e = 2n / (2n-1)(1 - \sum p_i^2)$]. Também, foram estimados o índice de fixação [$F = 1 - (H_o/H_e)$] de Wright (1978): as taxas de cruzamento aparente [$t = (1-F)/(1+F)$] (Wright, 1921): as estatísticas de F de Wright (1965) [$F_{IT} = F_{ST} + (1 - F_{ST}) F_{IS}$] e as distâncias genéticas não-viesadas de Nei (1978) ($D = - \ln I$; $I = J_{xy} / \sqrt{J_x J_y}$, em que J_{xy} , J_x e J_y são as médias aritméticas dos

Tabela 1. Localização de sete subpopulações de *Euterpe edulis* Martius, situadas em fragmentos florestais no Rio Grande do Sul

Populações/ Subpopulações	Latitude (S)	Longitude (W)	Altitude (m)
Depressão Central (Floresta Estacional)			
<i>Floresta Estacional Decidual</i>			
Candelária	29° 42' 21"	52° 49' 57"	280
Santa Cruz do Sul	29° 40' 48"	52° 26' 52"	136
Venâncio Aires	29° 30' 32"	52° 16' 50"	436
<i>Floresta Estacional Semidecidual</i>			
Mariana Pimentel	30° 19' 15"	51° 30' 09"	119
Região Litorânea (Floresta Ombrófila Densa)			
Caraá	29° 48' 12"	50° 17' 37"	38
Terra de Areia	29° 38' 16"	50° 06' 48"	14
Torres	29° 19' 03"	49° 50' 08"	16

Tabela 2. Nomenclatura das isoenzimas e sistemas tampão do gel empregados

Isoenzima	EC n°.	Sistema tampão
α -Esterase (α -EST)	E.C.3.1.1.1	TC
6-Fosfogluconato desidrogenase (6-PGDH)	E.C.1.1.1.4.4	CM
Fosfogluco mutase (PGM)	E.C.5.4.2.2	CM
Fosfogluco isomerase (PGI)	E.C.5.3.1.9	CM
Glutamato-oxaloacetato transaminase (AAT)	E.C.2.6.1.1	LB
Leucina aminopeptidase (LAP)	E.C.3.4.11.1	CM
Malato desidrogenase (MDH)	E.C.1.1.1.37	CM
Peroxidase (PRX)	E.C.1.11.1.7	TC

Os sistemas-tampões empregados foram: Citrato Morfolina (CM) – cuba: ácido cítrico 0,04 M, ajustado para pH 6,1 com N-(3-aminopropil) morfolina; gel: diluição a 1:20 do tampão da cuba (Clayton & Tretiak, 1972); Tris Citrato (TC) – cuba: tris 0,223 M, ácido cítrico 0,086 M, ajustado para pH 7,5; gel: diluição a 3,5% do tampão da cuba (Jarret & Litz, 1986); Lítio Borato (LB) – cuba: ácido bórico 0,19 M, hidróxido de lítio 0,04 M, pH 8,3; gel: 90% tris 0,05 M e ácido cítrico 0,007 M, pH 8,3 e 10% tampão da cuba (Alfenas *et al.*, 2006). A eletroforese foi conduzida em câmara fria a 5°C, nas seguintes condições: (i) 150 V e 20 mA, durante cerca de oito horas, pelo sistema tampão Tris Citrato (TC); (ii) 250 V e 25 mA por aproximadamente dez horas, pelo sistema-tampão Citrato Morfolina (CM); e (iii) 350 V e 25 mA durante cerca de dez horas, no sistema tampão Lítio Borato (LB).

alelos j_x, j_y e j_{xy}). As distâncias genéticas foram utilizadas para gerar dendrogramas, empregando o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os padrões de bandas observados nos vários sistemas isoenzimáticos utilizados são mostrados na Figura 1. Foram analisados 15 locos, dentre os quais dois apresentaram-se monomórficos (Mdh-2 e Prx-3). No loco Aat, a frequência do alelo mais comum ultrapassou 95% em todas as subpopulações, estando completamente fixado em Torres e Mariana Pimentel. No geral, os demais locos foram polimórficos, pelo critério de 95% de probabilidade. No entanto, na população da Floresta Estacional, o alelo A_1 do loco Est-3 esteve próximo da fixação. O mesmo foi observado com o alelo A_1 do loco Lap em Torres, Caraá, Venâncio Aires e Candelária. Em Mariana Pimentel o alelo A_1 esteve fixado nos locos Mdh-1, Mdh-2 e Est-1. Em Terra de Areia,

o alelo A_1 esteve fixado no loco Est-3 (Tabela 3). A presença de alelos fixados nas populações é um indicativo de adaptação. Esses alelos podem ter sido favorecidos pelas condições ambientais das áreas onde as populações estão situadas, atingindo níveis próximos ou a completa fixação. A destruição dos habitats naturais do palmitreiro pode levar à erosão genética, pela eliminação de alelos relacionados com importantes características adaptativas, aumentando os riscos de extinção da espécie.

No total, foram identificados 42 alelos, sendo que o número médio de alelos por loco (A_p) foi igual a 2,2, nas duas populações analisadas. O alelo A_4 no loco Prx-2 e o alelo A_4 no loco Pgm foram exclusivos de Terra de Areia, sendo considerados raros por sua baixa frequência. Outros alelos raros também foram encontrados na Floresta Ombrófila Densa, como o alelo A_3 no loco Est-1 em Torres e Caraá; o alelo A_3 no loco Prx-1 em Terra de Areia e o alelo A_3 no loco Pgi-1 em Terra de Areia e Caraá. O alelo A_3 no loco Mdh-1 e o alelo A_5 no loco 6-Pgdh-2 foram encontrados somente na Floresta Estacional, em Venâncio Aires e

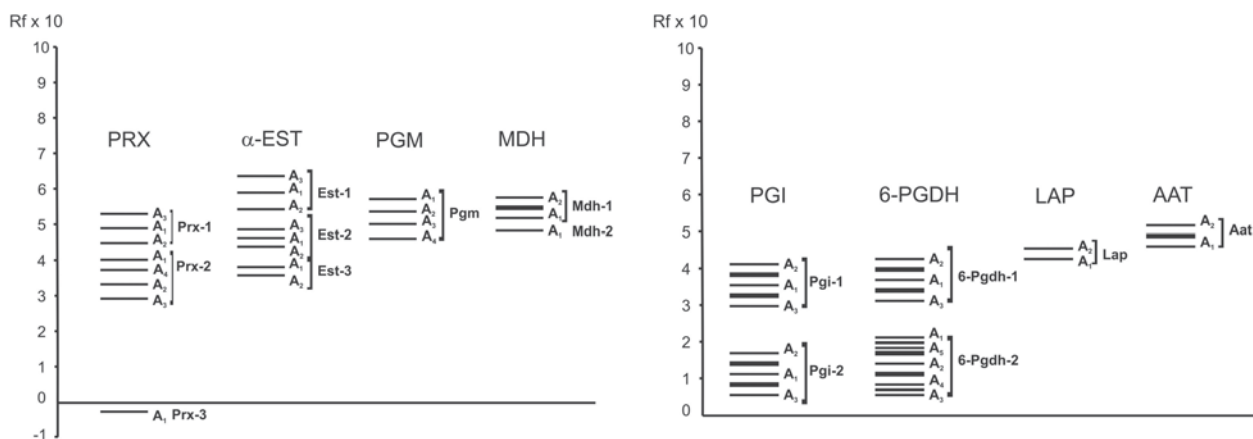


Figura 1. Diagrama da variação isoenzimática de populações de *Euterpe edulis* Martius do Rio Grande do Sul. As isoenzimas PRX, α -EST, PGM e LAP são monoméricas e as isoenzimas MDH, PGI, 6-PGDH e AAT são consideradas diméricas

Tabela 3. Frequências alélicas e tamanho da amostra (N) de populações de *Enterpe edulis* Martius, com base em 15 locos isoenzimáticos

Locos	Alelos	Populações											
		Região Litorânea			Depressão Central			Mariana Pimentel					
		Torres	Terra de Areia	Caraá	Venâncio Aires	Santa Cruz do Sul	Candelária	Mariana Pimentel					
	N	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160
Mdh-1	1	0,9469	0,8812	0,9406	0,8576	0,7063	0,8688	1,0000	0,7063	0,8688	1,0000	0,7063	0,8688
	2	0,0531	0,1187	0,0594	0,1389	0,2938	0,1125	0,0000	0,2938	0,1125	0,0000	0,2938	0,1125
	3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0035	0,0000	0,0187	0,0000	0,0000	0,0187	0,0000	0,0000	0,0187
Mdh-2	1	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	1	1,0000	0,9969	0,9778	0,9757	0,9938	0,9531	1,0000	0,9938	0,9531	1,0000	0,9938	0,9531
Aat	1	0,0000	0,0031	0,0222	0,0243	0,0063	0,0469	0,0000	0,0063	0,0469	0,0000	0,0063	0,0469
	2	0,0000	0,0031	0,0222	0,0243	0,0063	0,0469	0,0000	0,0063	0,0469	0,0000	0,0063	0,0469
	2	0,0000	0,0031	0,0222	0,0243	0,0063	0,0469	0,0000	0,0063	0,0469	0,0000	0,0063	0,0469
α -Est-1	1	0,9187	0,8931	0,7469	0,8264	0,8365	0,8176	1,0000	0,8365	0,8176	1,0000	0,8365	0,8176
	2	0,0656	0,1069	0,2500	0,1597	0,1478	0,1792	0,0000	0,1478	0,1792	0,0000	0,1478	0,1792
	3	0,0156	0,0000	0,0031	0,0139	0,1570	0,0031	0,0000	0,1570	0,0031	0,0000	0,1570	0,0031
α -Est-2	1	0,7406	0,8844	0,5969	0,6042	0,8875	0,7844	0,6094	0,8875	0,7844	0,6094	0,8875	0,7844
	2	0,2562	0,1125	0,4031	0,3750	0,1125	0,1938	0,3906	0,1125	0,1938	0,3906	0,1125	0,1938
	3	0,0031	0,0031	0,0000	0,0208	0,0000	0,0219	0,0000	0,0208	0,0219	0,0000	0,0208	0,0219
α -Est-3	1	0,9406	1,0000	0,9088	0,9826	0,9812	0,9906	0,9766	0,9812	0,9906	0,9766	0,9812	0,9906
	2	0,0594	0,0000	0,0912	0,0174	0,0187	0,0094	0,0234	0,0187	0,0094	0,0234	0,0187	0,0094
	1	0,9875	0,7875	0,9938	0,9861	0,8313	0,9938	0,9219	0,8313	0,9938	0,9219	0,8313	0,9938
Lap	1	0,0125	0,2125	0,0063	0,0139	0,1688	0,0063	0,0781	0,1688	0,0063	0,0781	0,1688	0,0063
	2	0,8719	0,9125	0,9500	0,7812	0,8156	0,9146	0,6875	0,8156	0,9146	0,6875	0,8156	0,9146
	1	0,1281	0,0813	0,0500	0,2014	0,1844	0,0854	0,3125	0,1844	0,0854	0,3125	0,1844	0,0854
Prx-1	1	0,0000	0,0063	0,0000	0,0174	0,0000	0,0000	0,0000	0,0174	0,0000	0,0000	0,0174	0,0000
	2	0,6813	0,6750	0,6906	0,6493	0,6406	0,6500	0,4922	0,6406	0,6500	0,4922	0,6406	0,6500
	1	0,2031	0,2500	0,3094	0,2882	0,3156	0,3312	0,3984	0,3156	0,3312	0,3984	0,3156	0,3312
Prx-2	1	0,1156	0,0531	0,0000	0,0625	0,0437	0,0187	0,1094	0,0437	0,0187	0,1094	0,0437	0,0187
	2	0,0000	0,0031	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	1	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Prx-3	1	0,9313	0,9688	0,8719	0,8438	0,8500	0,9281	0,8750	0,8500	0,9281	0,8750	0,8500	0,9281
	2	0,0688	0,0312	0,1125	0,1285	0,1500	0,0719	0,1250	0,1500	0,0719	0,1250	0,1500	0,0719
	3	0,0000	0,0000	0,0156	0,0278	0,0000	0,0000	0,0000	0,0278	0,0000	0,0000	0,0278	0,0000
6Pgdh-1	1	0,7031	0,6625	0,5750	0,4653	0,5594	0,4375	0,8047	0,5594	0,4375	0,8047	0,5594	0,4375
	2	0,2437	0,2875	0,3250	0,2778	0,3594	0,2625	0,1797	0,3594	0,2625	0,1797	0,3594	0,2625
	3	0,0469	0,0500	0,1000	0,2188	0,0813	0,2562	0,0156	0,0813	0,2562	0,0156	0,0813	0,2562
6Pgdh-2	1	0,0063	0,0000	0,0000	0,0278	0,0000	0,0219	0,0000	0,0278	0,0219	0,0000	0,0278	0,0219
	2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0104	0,0000	0,0219	0,0000	0,0104	0,0219	0,0000	0,0104	0,0219
	5	0,8000	0,8187	0,6531	0,6806	0,8250	0,7688	0,5781	0,8250	0,7688	0,5781	0,8250	0,7688
Pgi-1	1	0,2000	0,1781	0,3312	0,3194	0,1750	0,1969	0,4141	0,1750	0,1969	0,4141	0,1750	0,1969
	2	0,0000	0,0031	0,0156	0,0000	0,0000	0,0344	0,0078	0,0000	0,0344	0,0078	0,0000	0,0344
	3	0,7250	0,6219	0,6281	0,5625	0,5625	0,6156	0,5547	0,6219	0,6156	0,5547	0,6219	0,6156
Pgi-2	1	0,2719	0,2844	0,3625	0,3299	0,3219	0,3500	0,2891	0,3219	0,3500	0,2891	0,3219	0,3500
	2	0,0031	0,0938	0,0094	0,1076	0,1156	0,0344	0,1562	0,1156	0,0344	0,1562	0,1156	0,0344
	3	0,8469	0,6656	0,7312	0,8507	0,7500	0,8438	0,9062	0,8507	0,8438	0,9062	0,8507	0,8438
Pgm	1	0,1531	0,2594	0,2656	0,1493	0,2500	0,1562	0,0938	0,2500	0,1562	0,0938	0,2500	0,1562
	2	0,0000	0,0563	0,0031	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0563	0,0000	0,0000	0,0563	0,0000
	4	0,0000	0,0187	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0187	0,0000	0,0000	0,0187	0,0000

N: número de amostras Número total de amostras: 1120

Candelária. Outros alelos raros, detectados na Floresta Estacional foram A_3 nos locos Est-2, Prx-1, 6-Pgdh-1 e Pgi-1 e A_4 no loco 6-Pgdh-2 (Tabela 3). Os diferentes alelos raros encontrados nas duas populações podem ter refletido as diferentes características de cada bioma em que estão situadas.

Na média, a porcentagem de locos polimórficos (P) nas duas populações estudadas foi igual a 68%. A população da Depressão Central (Floresta Estacional) apresentou heterozigosidade média observada (H_o) igual a 0,250 e esperada (H_e) igual a 0,254. Na Floresta Ombrófila Densa, a heterozigosidade média observada (H_o) foi de 0,228 e a esperada (H_e) igual a 0,230. Esses resultados indicaram ligeira deficiência de heterozigotos nas duas populações (Tabela 4).

Comparativamente, Reis (1996) encontrou elevados valores de variabilidade genética em análise isoenzimática de progênies de sete populações naturais de palmitreiro, situadas em duas regiões geográficas, sendo o Médio Vale do Rio Itajaí-Açu (SC) e Vale do Rio Ribeira do Iguape (SP). O autor utilizou os sistemas isoenzimáticos PRX, PGM, PGI e G6PDH, analisando sete locos polimórficos. Nesse estudo, a heterozigosidade média observada (H_o) foi igual a 0,4 e a heterozigosidade média esperada (H_e) foi igual a 0,44. A elevada diversidade genética na Floresta Ombrófila Densa seria esperada. No entanto, as estimativas de diversidade genética podem ter sido superestimadas, pois foram analisados apenas sete locos. Analisando locos altamente variáveis e com frequências alélicas

bem distribuídas, os valores de diversidade genética serão maiores.

Considerações semelhantes foram realizadas por Silva (2004), que analisou uma população de palmitreiro situada na Floresta Nacional de Ibirama, SC. Além dos sistemas isoenzimáticos utilizados por Reis (1996), foram também empregados á-EST, SKDH, 6-PGDH, NADHDH, DIA e IDH, avaliando-se 13 locos. Na população a heterozigosidade média observada (H_o) foi igual a 0,195 e a heterozigosidade média esperada (H_e) foi igual a 0,216. O autor concluiu que os valores encontrados foram menores, pois foi analisado um maior número de sistemas isoenzimáticos, os quais apresentaram locos menos variáveis e com menor número de alelos por locos.

Em estudo realizado por Conte *et al.* (2003), foram avaliados 16 locos isoenzimáticos em uma população de *E. edulis*, situada no município de São Pedro de Alcântara (Santa Catarina). Foram empregados sistemas isoenzimáticos semelhantes aos utilizados por Reis (1996) e Silva (2004). Foram amostrados indivíduos de cinco categorias de plantas. Na categoria de plântulas com altura de inserção da folha flecha entre 11 e 50 cm, a heterozigosidade média observada (H_o) foi de 0,270 e a heterozigosidade média esperada (H_e) foi de 0,284. Os autores concluíram que a constituição genotípica dos indivíduos está bastante relacionada com os indivíduos remanescentes de exploração praticada no passado e com a origem das sementes que colonizaram a área, fatores que podem ter restringido a base genética nessa população (Conte *et al.*, 2003).

Tabela 4. Variabilidade isoenzimática de populações de *Euterpe edulis* Martius, com base em 15 locos

Populações/ Subpopulações	N	Ap	P%	Ho	He	F	t
Depressão Central (Floresta Estacional)							
<i>Floresta Estacional Decidual</i>							
Candelária	160	2,467(0,546)	66,67	0,241(0,264)	0,238(0,206)	-0,013	1,03
Santa Cruz do Sul	160	2,133(0,639)	73,33	0,212(0,264)	0,271(0,193)	0,218	0,64
Venâncio Aires	160	2,533(0,994)	66,67	0,253(0,292)	0,276(0,223)	0,083	0,85
Média	160	2,378	68,89	0,235	0,262	0,103	0,81
<i>Floresta Estacional Semidecidual</i>							
Mariana Pimentel	160	2,000(0,756)	60,00	0,265 (0,304)	0,246(0,216)	-0,077	1,17
Média	160	2,189	64,44	0,250	0,254	0,016	0,97
<i>Região Litorânea (Floresta Ombrófila Densa)</i>							
Caraá	160	2,267(0,704)	73,33	0,297(0,279)	0,256(0,205)	-0,160	1,38
Terra de Areia	160	2,400(0,986)	66,67	0,183(0,248)	0,230(0,196)	0,204	0,66
Torres	160	2,200(0,862)	73,33	0,205(0,206)	0,203(0,171)	-0,010	1,02
Média	160	2,289	71,11	0,228	0,230	0,009	0,98
Média geral	160	2,239	67,78	0,239	0,242	0,012	0,98

N: tamanho da amostra; Ap: número médio de alelos por loco; P: proporção de locos polimórficos (segundo o critério de 95% de probabilidade); H_o : heterozigosidade média observada;

H_e : heterozigosidade média esperada; F: índice de fixação de Wright (1978); t: taxa de cruzamento (Wright, 1921). Os números entre parênteses indicam o desvio-padrão da estimativa.

As estimativas de diversidade genética no presente estudo foram ligeiramente inferiores às encontradas por Conte *et al.* (2003), sugerindo ser ainda mais restrita a base genética encontrada nas populações do Rio Grande do Sul. A base genética restrita possivelmente foi devida a causas naturais e, ou, interferência antrópica. O Rio Grande do Sul correspondeu ao limite extremo de dispersão de *E. edulis*, na Floresta Ombrófila Densa e na Floresta Estacional. A Floresta Ombrófila Densa caracteriza-se como uma mata perenifólia, com densa vegetação e com expressiva diversidade faunística. A dinâmica ecológica dessa floresta mostra-se propícia ao estabelecimento de populações de palmitreiro com elevada variabilidade genética (Reis, 1996; Conte *et al.*, 2003). No Rio Grande do Sul, esse fato foi verificado apenas na subpopulação de Caraá (Floresta Ombrófila Densa). Essa subpopulação apresentou a mais elevada diversidade genética entre as estudadas ($H_o = 0,297$), sendo, possivelmente, o centro de dispersão da espécie na região litorânea e estruturando subpopulações com menor diversidade genética em seu entorno.

A Floresta Estacional apresenta diversidade biológica mais limitada e está situada em área de clima subtropical, caracterizado por precipitações médias de 1700 mm, temperatura média mais reduzida e ocorrência de geadas durante o inverno, o que condicionou a adaptação da espécie nessas áreas. A hipótese de “princípio de fundador” deve ser considerada, pois alguns indivíduos podem ter migrado, originando subpopulações com variabilidade genética mais restrita (Futuyma, 2002).

Também, a reduzida diversidade genética pode estar associada à contínua fragmentação e exploração de populações de *E. edulis* no Rio Grande do Sul. Essas interferências antrópicas prejudicaram a restauração das populações naturais, restringindo a oferta anual de propágulos. Isto pode ter dificultado a sobrevivência da espécie por meio da formação de banco de plântulas. Martins-Corder *et al.* (2007) analisaram a demografia, o recrutamento e a regeneração natural de *E. edulis* nas populações do Rio Grande do Sul, durante dois anos. Os autores verificaram que a maioria dos indivíduos pertencia à categoria de plântulas e que uma reduzida porcentagem foi de indivíduos adultos. No entanto, no segundo ano, a fase regeneração foi comprometida na população da Floresta Estacional Decidual, por causa da ocorrência de cortes clandestinos na área de estudo, provocando considerável redução dos indivíduos da fase de plântulas. Deste modo, a contínua exploração de indivíduos de palmitreiro vem provocando uma redução nas chances de sobrevivência da espécie.

A estimativa média do índice de fixação nas populações estudadas ($F = 0,01$) indicou ligeiro excesso de homozigotos (Tabela 4). Na maioria das subpopulações, o índice foi próximo de zero ou negativo. As estatísticas de F (Wright, 1965) confirmaram os reduzidos níveis de endogamia encontrados na maioria das subpopulações, sendo a estimativa da endogamia total (F_{IT}) igual a 0,07 e da endogamia média (F_{IS}) igual a 0,03. A endogamia média, mesmo reduzida, indicou que os locos estudados não se

Tabela 5. Índice de fixação dentro (F_{IS}), entre (F_{ST}) e total da espécie (F_{IT}), segundo Wright (1965), fluxo gênico aparente (Nm) e teste do qui-quadrado para os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg em populações de *Euterpe edulis* Martius, com base em 15 locos isoenzimáticos

Loco	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}	Nm	χ^2	GL	P
Aat	0,225	0,018	0,239	13,636	66,270*	1	<0,01
Est-1	0,105	0,048	0,147	4,987	478,348*	3	<0,01
Est-2	-0,201	0,064	-0,124	3,643	34,338*	3	<0,01
Est-3	0,307	0,030	0,328	8,014	121,89*	1	<0,01
Lap	0,654	0,095	0,687	2,381	532,853*	1	<0,01
Mdh-1	0,576	0,062	0,602	3,784	523,493*	3	<0,01
Mdh-2	-	0,000	-	-	-	-	-
Prx-1	0,558	0,082	0,594	2,818	1349,561*	3	<0,01
Prx-2	-0,348	0,018	-0,323	13,335	189,405*	6	<0,01
Prx-3	-	0,000	-	-	-	-	-
6-Pgdh-1	0,093	0,022	0,113	10,939	19,344*	3	<0,01
6-Pgdh-2	-0,223	0,042	-0,171	5,664	923,530*	10	<0,01
Pgi-1	0,168	0,036	0,198	6,651	401,277*	3	<0,01
Pgi-2	-0,148	0,011	-0,136	23,429	59,941*	3	<0,01
Pgm	0,274	0,026	0,293	9,238	231,984*	6	<0,01
Média	0,033	0,040	0,072	6,004	-	-	-

Os locos Mdh-2 e Prx-3 foram monomórficos, não sendo calculados os valores de χ^2 .

χ^2 : qui-quadrado GL: graus de Liberdade

P: probabilidade de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

encontraram em Equilíbrio de Hardy Weinberg ($P < 0,05$), (Tabela 5). Resultados semelhantes foram também descritos por Reis (1996) e Conte (2001) em populações de palmiteiro naturais de Santa Catarina. Reis (1996) relatou que a endogamia encontrada para progênies de sete populações de palmiteiro pode ter sido causada por cruzamentos não-aleatórios. O período de floração da espécie ocorre em cerca de cinco meses, não-sendo igualmente distribuído entre todos os indivíduos da população. Tal aspecto, associado às características do microambiente, pode favorecer a ocorrência de cruzamentos não aleatórios entre os indivíduos. Adicionalmente, o desequilíbrio verificado nas populações pode estar associado à deriva genética, decorrente do “efeito de fundador” da população e da fragmentação florestal (Conte, 2001).

As estimativas das taxas de cruzamento confirmaram a alogamia predominante na espécie ($t = 0,98$). Como as populações de palmiteiro sofreram intensa fragmentação, seriam supostos níveis mais elevados de endogamia. De acordo com Cardoso *et al.* (2000), a ocorrência de indivíduos isolados possibilitaria trocas gaméticas entre inflorescências da mesma planta, aumentando as chances de cruzamentos endogâmicos. No entanto, há alguns indícios de que prováveis mecanismos de autoincompatibilidade pós-zigótica, presentes na espécie, poderiam favorecer o intercruzamento e impedir a expressão da endogamia. Williams *et al.* (1994) relatam que a autoincompatibilidade pós-zigótica atua em estágios precoces do desenvolvimento do embrião ou em fases avançadas, causando o aborto de frutos. No presente estudo, em algumas subpopulações de *E. eduli*, foi observado que uma quantidade significativa das sementes coletadas não apresentava embriões. As plantas matrizes produziram somente um a dois cachos com número reduzido de frutos.

A análise da estrutura genética, por meio das estatísticas de Wright (1965), indicou que a maioria da variabilidade genética esteve distribuída dentro das populações estudadas. Cerca de 4% da diversidade genética foi encontrada entre as populações ($F_{ST} = 0,04$) (Tabela 5). Em diversos trabalhos realizados com *E. edulis* foram encontrados resultados similares (Reis, 1996; Conte, 2004; Gaiotto *et al.*, 2003). Estudos utilizando outras espécies arbóreas alógamas de ciclo longo mostraram tendências semelhantes (Jump & Peñuelas, 2006; Cole *et al.*, 2007).

No presente estudo, a divergência genética reduzida entre as populações foi confirmada pelas estimativas de distância genética. A amplitude de variação em relação às diversas subpopulações analisadas foi de 0,006 (Terra de Areia e Santa Cruz do Sul) a 0,03 (Mariana Pimentel e Santa Cruz do Sul). A distância genética reduzida, que foi encontrada entre as subpopulações, pode explicar o elevado valor de fluxo gênico encontrado nas populações

($Nm = 6,0$) (Tabela 5). No entanto, o fluxo gênico pode representar um acontecimento passado, quando as populações eram interligadas por florestas praticamente contínuas (Kageyama *et al.*, 2003). O acelerado processo de fragmentação de “habitats” pode vir a aumentar a divergência genética ao longo das gerações, ameaçando ainda mais a sobrevivência da espécie nestas áreas.

A análise do agrupamento pelo método UPGMA sugeriu a formação de três grupos (Figura 2). A subpopulação de Mariana Pimentel mostrou-se isolada. As subpopulações com maior distância geográfica são Candelária e Torres (284,1 km), estando inseridas no mesmo grupo. As subpopulações mais próximas, geograficamente, Venâncio Aires e Santa Cruz do Sul (25,6 km), foram incluídas em grupos diferentes. Os resultados indicaram que não houve uma relação direta entre distância genética e distância geográfica.

Embora não tenha ocorrido aumento na divergência genética entre as populações do Rio Grande do Sul, estas continuam sendo exploradas indiscriminadamente, o que poderá comprometer severamente a sobrevivência da espécie em curto prazo. A eliminação de populações e de indivíduos de palmiteiro é responsável pela perda de alelos, conduzindo a espécie à erosão genética, o que se torna desvantajoso para iniciar programas de melhoramento genético e conservação. Materiais genéticos de outras áreas de ocorrência do palmiteiro precisariam ser introduzidos para ampliar a base genética. Além disso, deveria ser intensificada a fiscalização nestas áreas, para reduzir a exploração clandestina e poder delinear estratégias de conservação e manejo sustentável da espécie.

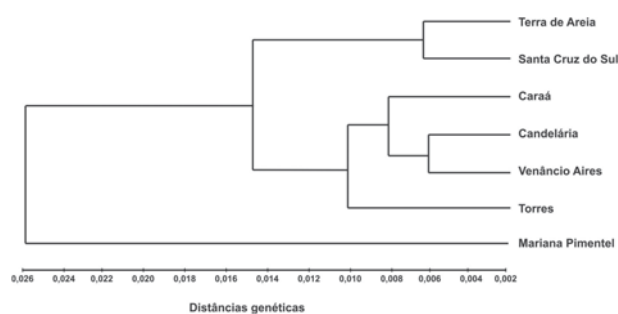


Figura 2. Dendrograma baseado no método de agrupamento UPGMA, de sete subpopulações de *Euterpe edulis* Martius, utilizando as distâncias genéticas não-viesadas de Nei (1978).

CONCLUSÕES

A diversidade genética das populações de palmiteiro do Rio Grande do Sul apresentou-se reduzida, o que possivelmente foi atribuído à condição de limite extremo de ocorrência da espécie, às características climáticas condicionantes de sua adaptação e ao “princípio fundador”. Sugere-se que a fragmentação florestal também provocou a redução da variabilidade genética nas populações.

Apesar de a base genética das populações de palmeiteiro ser considerada restrita, os índices de fixação sugeriram reduzida endogamia. Provavelmente, mecanismos de autoincompatibilidade pós-zigótica favoreceram a eliminação de embriões oriundos de autofecundação.

A maioria da diversidade genética encontrada foi distribuída dentro das populações, confirmando a tendência para espécies alógamas. A fragmentação florestal não conduziu ao aumento da divergência genética entre as populações estudadas.

A base genética restrita das populações analisadas pode vir a comprometer irreversivelmente as estratégias de manejo, conservação e melhoramento genético de *E. edulis*. Dessa maneira, o monitoramento das populações deveria ser contínuo ao longo das gerações.

AGRADECIMENTOS

Pelo suporte imprescindível dado a este estudo, agradecemos imensamente às seguintes empresas: PETROBRAS (por meio do Programa Petrobras Ambiental), Fundo Nacional do Meio Ambiente (FNMA/MMA) e Corn Products Brasil.

REFERÊNCIAS

- Alfenas AC, Brune W, Oliveira JR, Alonso SK & Scortichini M (2006) Extração de proteínas para eletroforese. In: Alfenas AC (Ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa, Ed. da UFV, p.85-114.
- Cardoso SRS, Eloy B, Provan J, Cardoso MA & Ferreira PCG (2000) Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. populations estimated by AFLP analysis. *Molecular Ecology*, 9:753-1760.
- Carvalho PER (2003) Espécies arbóreas brasileiras. Brasília, Embrapa. 1040p.
- Clayton J & Tretiak D (1972) Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. *Journal of Fisheries Research Board of Canada*, 29:1169-1172.
- Cole DM, White TL & Nair PKR (2007) Maintaining genetic resources of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth): The role of seed-migration and swidden-fallow management in northeastern Peru. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54:189-204.
- Conte R (2001) Genética do recrutamento de plantas em uma população natural do palmeiteiro (*Euterpe edulis* Mart.). Dissertação de mestrado. Florianópolis, UFSC. 113p.
- Conte R (2004) Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microsátélites. Tese de doutorado. Piracicaba, ESALQ/USP. 122p.
- Conte R, Nodari RO, Vencovsky R & Reis MS (2003) Genetic diversity and recruitment of the tropical palm, *Euterpe edulis* Mart., in a natural population from the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity*, 91: 401-406.
- Futuyma DJ (2002) *Biologia evolutiva*. 2. ed. Ribeirão Preto, FUNPEC. 631p.
- Gaiotto FA, Grattapaglia D & Vencovsky R (2003) Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). *Journal of Heredity*, 94:399-406.
- Galetti M & Fernandez JC (1998) Palm heart harvesting in the Brazilian Atlantic forest: changes in industry structure and the illegal trade. *Journal of Applied Ecology*, 35:294-301.
- Hamrick JL (2004) Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecology and Management*, 197:323-335.
- Jarret RL & Litz RE (1986) Isozymes as genetic markers in bananas and plantains. *Euphytica*, 35:539-549.
- Jump AS & Peñuelas J (2006) Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. *PNAS*, 23:8096-8100.
- Kageyama PY, Sebben AM, Ribas LA, Gandara FB, Castellen M, Perecim MB & Vencovsky R (2003) Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. *Scientia Forestalis*, 84: 421-427.
- Lowe AJ, Boshier D, Ward M, Bacles CFE & Navarro C (2005) Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity*, 95:255-273.
- Mantovani A & Morellato P (2000) Fenologia da floração, frutificação, mudança foliar e aspectos da biologia floral. *Sellowia*, Itajaí, 49-52:23-38.
- Martins-Corder MP (1994) Caracterização isoenzimática de híbridos de *Eucalyptus* spp. Tese de doutorado. Botucatu, Universidade Estadual Paulista. 113p.
- Martins-Corder MP, Zambiasi DC, Fialho LEB & Disarz R (2007) Análise demográfica, recrutamento e regeneração natural de *Euterpe edulis* Martius no Rio Grande do Sul (Submetido).
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89:583-590.
- REIS MS (1996) Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmeiteiro (*Euterpe edulis* Martius). Tese de Doutorado. Piracicaba, ESALQ/USP, 210p.
- Reis A, Kageyama PY, Reis MS & Fantini A (1996) Demografia de *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae) em uma Floresta Ombrófila Densa Montana, em Blumenau (SC). *Sellowia*, 45-48:13-45.
- Reis MS, Guerra MP, Nodari RO, Reis A & Ribeiro RJ (2000) Distribuição geográfica e situação atual das populações na área de ocorrência de *Euterpe edulis* Martius. *Sellowia*, 49-52:324-335.
- Silva JZ (2004) Efeito de diferentes intensidades de manejo simuladas sobre a diversidade genética de uma população natural de palmeiteiro (*Euterpe edulis* Martius). Dissertação de mestrado. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina. 90p.
- Williams EZ, Clarke AE & Knox RB (1994) Genetic control of Self-Incompatibility and Reproductive Development in Flowering Plants. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. 541p.
- Wright S (1921) Systems of mating. *Genetics*, 6:111-178.
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19:395-420.
- Wright S (1978) *Evolution and the genetics of populations*. Vol. 4. Variability within and among natural populations. Chicago, University of Chicago Press. 590p.
- Yeh FC & Boyle T (1999) *Pogene*, Version 1.31 Software Microsoft Windows – based freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta, Canada.
- Young A & Boyle TJ (2000) Forest fragmentation. In: Young A, Boshier D & Boyle T (Eds.) *Forest conservation genetics: principles and practice*. Collingwood, Csiro Publishing. p.123-132.