

# CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL EM MACAÚBA (*Acrocomia aculeata*) POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

LUCIANA P. SCHINCARIOL<sup>1</sup>; REGINA H. G. PRIOLLI<sup>2</sup>; CARLOS A. COLOMBO<sup>3</sup>

Nº 0800018

## Resumo

A macaúba é uma palmeira monocaule com ampla distribuição geográfica nas áreas tropicais americanas e com potencial para produção de biodiesel, a partir da sua polpa, e de cosméticos, a partir da sua amêndoa. Em função da quase inexistência de informações sobre a espécie, o projeto em questão teve por objetivo estudar a diversidade genética e a estrutura populacional da espécie ocorrendo em regiões do estado de São Paulo onde a espécie ocorre espontaneamente. Foram empregados quatro locos SSR desenvolvidos em nossos laboratórios e os resultados obtidos revelam ampla diversidade da espécie, que é maior entre populações do que entre regiões. Também, não foi observado forte associação entre a estruturação genética observada e os fatores ambientais das localidades de coleta, exceto para as populações de São Simão e São Pedro de Viterbo e Piquerobi, cujos grupamentos formados são basicamente representados por indivíduos destas localidades. Embora preliminares, as informações geradas são de grande interesse para a coleta de germoplasma e conservação da variabilidade genética da espécie e ponto de partida para o pré-melhoramento dessa palmeira.

## Abstract

The macaw is a palm of single stem with broad geographical distribution in tropical America and with the potential to produce biodiesel, from its pulp, and cosmetics from their almond. Due to the almost lack of information on the species, the project in question aimed to study the genetic diversity and population structure of the species occurring in regions of the state of Sao Paulo where occurs spontaneously. Thought of four SSR loci developed in our laboratories the results show wide diversity of species, which is greater than between populations between regions. Also, we did not observe a strong association between the genetic structure observed and environmental factors observed in the places of collection, except to the genotypes from São Simão, São Pedro de Viterbo and Piquerobi, whose

---

<sup>1</sup>Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, PUCCAMP, Campinas-SP ✉  
luciana\_schincariol@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Colaborador: Pesquisador, CENTRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS/IAC, Campinas-SP.

<sup>3</sup>Orientador: Pesquisador, CENTRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS/IAC, Campinas-SP.

groups are represented by individuals of these localities. Although preliminary, the information generated is interesting to form a collection of germplasm and conservation of the species and starting point for pre-breeding of this palm.

## **Introdução**

A espécie *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart. é uma palmeira arborescente, monocaule, perenifólia e pertencente à família *Palmae*, podendo atingir acima de 15 m de altura. O estipe é ereto, recoberto pelos restos das folhas velhas, apresentando muitos espinhos em sua superfície e de aspecto crispado (LORENZI, 1992). Suas flores são pequenas, unissexuais e ambos os sexos estão presentes numa mesma inflorescência, agrupadas em cachos pendentes de até 80 cm de comprimento e protegidas por uma espata que pode atingir até dois metros (SCARIOT *et al.*, 1995). O fruto é globoso, com 2,5 a 5,0 cm de diâmetro, liso, de coloração marrom-amarelada quando maduro e apresenta mesocarpo branco ou amarelado, fibroso e mucilaginoso (TASSARO, 1996; LORENZI, 1992; SCARIOT *et al.*, 1991).

A macaúba é citada como uma das principais fontes de óleo vegetal dentre as palmeiras brasileiras com potencial para produção de biodiesel, podendo produzir ao redor de quatro mil litros de óleo por hectare/ano de dois tipos de óleo: o da polpa (biodiesel); e o óleo da amêndoa (indústria alimentícia) (CIPRIANO, 2006). A utilização de biodiesel como combustível tem apresentado um potencial promissor no mundo inteiro (COSTA NETO *et al.*, 2000) sendo que no Brasil visa o desenvolvimento integrado das tecnologias de produção, industrialização e uso do biodiesel e de misturas com diesel, a partir de óleos vegetais puros e residuais, produzidos regionalmente (CARNEIRO, 2003). Portanto, a presente proposta de estudo teve por finalidade gerar informações sobre a diversidade genética da macaúba com vistas à exploração mais racional dessa espécie. Para tanto, foram utilizados marcadores moleculares do tipo microssatélites ou SSR, desenvolvidos previamente em nossos laboratórios.

## **Material e Métodos**

Plantas de diferentes localidades do estado de São Paulo e Minas Gerais foram coletadas para o presente estudo (Figura 1). As populações bem como o número de amostras analisadas (entre parênteses) são: Campinas e Jaguariúna (10), Amparo, S. Negra e Lindóia (11), Casa Branca (7), Mococa (5), Dourado (8), Barbosa (7), São Pedro do Turvo (5), Ibituruna-Gupiara (6), Ibituruna (4), São Simão (10), Santa Rosa de Viterbo (8) e Piquerobi (11), totalizando 92 amostras. Os estudos foram conduzidos com quatro locos SSR (microssatélites), até o momento (Aacu07, Aacu10, Aacu12 e Aacu26), caracterizados e

publicados em Nucci et al. (2007). Os amplificadores SSR foram visualizados em seqüenciador automático ABI377. A partir da genotipagem realizada por meio do programa GENOTYPER, tendo sido calculadas as freqüências alélicas, o número de alelos por loco (A), a heterozigotidade observada (H<sub>0</sub>) e esperada (H<sub>e</sub>) e as

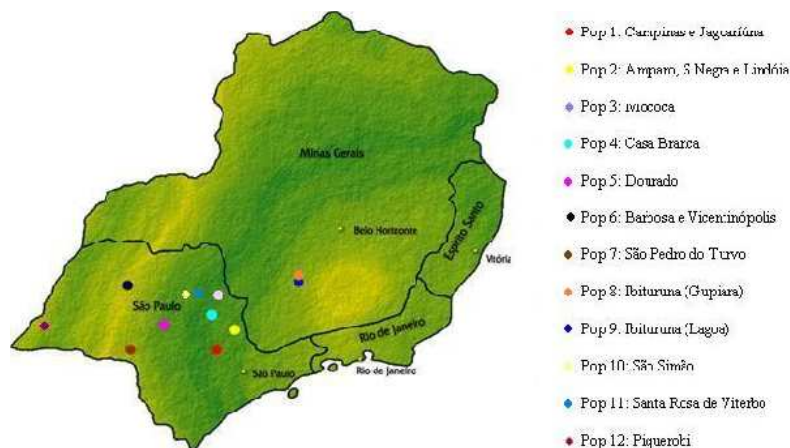


Figura 1. Mapas dos estados de São Paulo e Minas Gerais ilustrando 12 diferentes localidades de coleta de amostras de material botânico de macaúba para análises genéticas.

estatísticas F de Wright (F<sub>IS</sub>, F<sub>ST</sub> e F<sub>IT</sub>), estimadas utilizando o programa GDA (LEWIS & ZAYKIN, 2000). As estatísticas D<sub>ST</sub>, H<sub>S</sub>, H<sub>T</sub> e D<sub>ST</sub>, desenvolvidas por Nei (1978), foram determinadas utilizando o programa FSTAT (GOUDET, 2002). A população do estudo foi também analisada a partir do programa estatístico Structure (PRITCHARD et al. 2000), que assume equilíbrio gênico dos locos (HW) e equilíbrio de ligação e um modelo no qual existem K populações (K é desconhecido), cada uma caracterizada pelas freqüências alélicas de cada loco.

## Resultados e Discussão

Os motivos de repetição, seqüências dos primers utilizados para amplificação dos mesmos, amplitude dos amplificadores em pares de bases (pb), número de alelos por loco, heterozigotidade esperada e observada e temperatura de anelamento para obtenção dos amplificadores (PCR) encontram-se na Tabela 1.

O número de alelos por loco (N<sub>a</sub>) variou de 6 (Aacu07) a 9 (Aacu26), com média de 7,75. A H<sub>o</sub> apresentou valor mínimo de 0,1320 (Aacu10) e máximo de 0,4943 (Aacu26), com média de 0,3463, inferior ao esperado para todos os locos (Tabela 1). De uma maneira geral, os quatro locos apresentaram heterozigotidade média observada de nível reduzido, ou seja, abaixo de 50%, de acordo com OTT (1992). Todos os quatro locos apresentaram valores superiores a 50% para heterozigotidade média esperada, indicando elevada variabilidade genética dos marcadores analisados.

Todos os locos mostraram-se polimórficos e o índice de polimorfismo (PIC) apresentou valor médio de 0,691, variando de 0,618 (Aacu07) a 0,735 (Aacu26), sendo todos acima de 0,5.

Esse índice permite avaliar cada loco quanto ao grau de informação em estudos de segregação alélica e valores abaixo de 0,5 são considerados pouco informativos (BOTSTEIN *et al.*, 1980).

**Tabela 1** – Seqüências dos pares de *primers* desenvolvidos para *Acrocomia aculeata* que amplificaram locos microssatélites, com suas respectivas amplitudes alélicas, número de alelos, heterozigosidades esperadas e observadas e temperatura de anelamento.

LOCO	MOTIVO	SEQUENCIAS DOS PARES DE PRIMER (MEROS A CAUDA)	AMPLITUDE ALELICA (pb)	Na*	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	Ta (°C)
Aacu07	(GA) <sub>13</sub>	F ATCGAAGGCCCTCCAATACT R AAATAAGGGGACCTCCAA	153-177	6	0,6997	0,378	56
Aacu10	(AG) <sub>16</sub>	F TGCCACATAGAGTGCTTGCT R CTACCACATCCCCGTGAGTT	168-186	8	0,7716	0,132	56
Aacu12	(TC) <sub>20</sub>	F GAATGTGCGTGCTCAAAATG R AATGCCAAGTGACCAAGTCC	190-221	8	0,7952	0,382	56
Aacu26	(AC) <sub>13</sub> (AG) <sub>14</sub>	F ACTTGCGAGCCCCATATTGAG R CAGGAACAGAGGCAAGTTC	273-316	9	0,7702	0,4943	56
<b>TOTAL</b>				<b>31</b>	<b>0,7592</b>	<b>0,3463</b>	

\*Na: número de alelos, H<sub>e</sub> e H<sub>o</sub>: heterozigosidades esperada e observada, respectivamente.

Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade das 12 populações de estudo encontram-se resumidos na tabela 2, evidenciando o número de plantas de cada localidade, número médio de alelos, número total de alelos por loco polimórfico, heterozigosidades observada e esperada, sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, e o índice de fixação populacional.

**Tabela 2.** Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade em 12 populações de macaúba (*Acrocomia aculeata*) de diferentes localidades paulistas (exceto Ibituruna-MG), representando 92 genótipos.

População	N	n <sub>A</sub>	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	f
1. Campinas e Jaguariúna	10	4,5	0,5879	0,309	0,4892
2. Amparo, S. Negra e Lindóia	11	3,5	0,6159	0,2694	0,5768
3. Casa Branca	7	4,3	0,6855	0,2429	0,6695
4. Mococa	5	3,5	0,6778	0,2	0,7288
5. Dourado	8	4	0,685	0,4911	0,2991
6. Barbosa	7	5	0,728	0,3571	0,5294
7. São Pedro do Turvo	5	4	0,7706	0,275	0,6727
8. Ibituruna-Gupiara	6	4	0,7348	0,25	0,6808
9. Ibituruna-Lagoa	4	3,5	0,678	0,25	0,663
10. São Simão	10	2,5	0,4875	0,3528	0,2892
11. Santa Rosa de Viterbo	8	3,8	0,6263	0,4732	0,2579
12. Piquerobi	11	4,5	0,6042	0,4841	0,2063
<b>MÉDIA</b>	<b>7,7</b>	<b>3,9</b>	<b>0,6568</b>	<b>0,3296</b>	<b>0,5151</b>

N: número de indivíduos amostrados; n<sub>A</sub>: número médio de alelos; Ap: número total de alelos por loco polimórfico; H<sub>o</sub>: heterozigosidade observada; H<sub>e</sub>: heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg; f: índice de fixação.

acentuados de heterozigosidades foram observadas nas populações de Dourado (0,4911),

Piquerobi (0,4841) e Santa Rosa de Viterbo (0,4732), enquanto que os menores foram para Mococa (0,200), Casa Branca (0,2429) e Ibituruna (0,2500). O índice de fixação intrapopulacional ( $\hat{f} = \hat{F}_{IS}$ ), estimado em cada população através das heterozigosidades ( $H_o$  e  $H_e$ ), está apresentado na Tabela 4. O valor médio foi de  $\hat{f} = 0,5151$ , com variação de 0,2063 a 0,7288. Estes resultados, juntamente com os testes exatos de Fisher, indicam que as populações são mistas.

Em relação às análises sobre a estruturação da variabilidade genética das populações do estudo, apresentamos na tabela 3 estimativas das estatísticas F de Wright, do  $R_{ST}$  e do número de migrantes por geração ( $N_m$ ).

**Tabela 3** – Estimativa das estatísticas F de Wright, do  $R_{ST}$  e do numero de migrantes por geração ( $N_m$ ) em doze populações naturais de *Acrocomia aculeata*. Intervalo de confiança (IC) de 95% de probabilidade.

	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$	$R_{ST}$	$N_m^*$
<b>Estimativa</b>	0,482	0,5536	0,1373	0,18	0,6549
<b>Limite Superior (IC 95%)</b>	0,7051	0,75	0,1848		
<b>Limite Inferior (IC 95%)</b>	0,3301	0,4085	0,0831		

\*  $N_m$  calculado com base no  $R_{ST}$

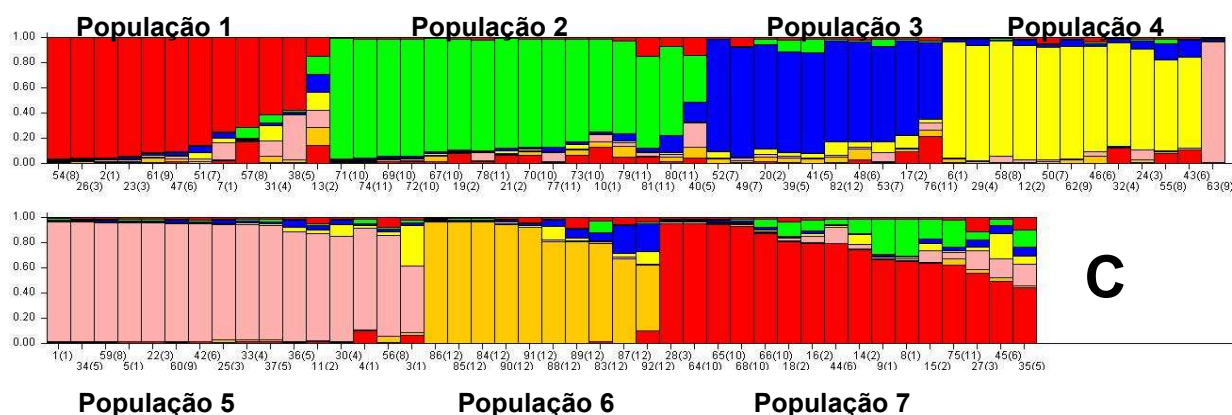
O índice de fixação da espécie ( $\hat{F}_{IS}$ ), estimado com base em quatro locos de microssatélites, ou 31 alelos e nas 12 populações, apresentou valor de 0,4820, acima do esperado para uma espécie alógama e abaixo do esperado para uma espécie autógena, sugerindo que a espécie é provavelmente mista.

O valor de  $R_{ST}$  estimado foi de 0,1800 e o de  $F_{ST}$  igual a 0,1373. Estas estimativas foram congruentes e significativamente diferentes de zero. O parâmetro  $N_m$  estimado com base na estimativa de  $R_{ST}$  (BARTON and SLATKIN, 1986) resultou no valor de 0,6549, indicando uma taxa de migrantes entre as populações de grandeza intermediária. Este valor pode ser considerado como indício de que as populações se encontram em um processo de diferenciação e com possível comprometimento de sua estrutura metapopulacional.

A população do estudo foi também analisada a partir do programa estatístico Structure (PRITCHARD et al. 2000). Para adoção do melhor K leva-se em consideração o menor desvio padrão que os locos oferecem quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, em cada K testado. Segundo esses autores, o verdadeiro valor de K é sempre desconhecido, porém, deve-se sempre ter como objetivo adotar o menor valor de K que capture a mais ampla estruturação dos dados. Foram testados 10 níveis de K (de 2 a 10) e um número de

interações igual a 10.000. A figura 2 ilustra o resultado da análise realizada no programa Structure, com K=7 representando o melhor número de populações encontradas, com seus respectivos indivíduos. Portanto, de acordo com esta figura, as sete populações mais bem representadas em função da frequência dos alelos encontrados seriam compostas por plantas de diferentes localidades, exceto para as populações 6 e 2, representadas pelas localidades 12 (Piquerobi) e 10 e 11 (São Simão e São Pedro de Viterbo, respectivamente).

Figura 2 Resultado da aplicação do programa Structure para representação da estrutura populacional de 92 plantas de macaúba em função da frequência de 31 alelos microssatélites, em função de diferentes números hipotéticos K (populações), sendo que o melhor K=7 o mais bem adaptado ao conjunto de dados analisados.



## Conclusões

Os resultados encontrados sugerem que a espécie tem comportamento misto de reprodução; existe uma elevada diversidade entre populações de *Acrocomia aculeata*; a diversidade genética é maior entre populações do que entre regiões e sugerem, também, um comprometimento da estrutura metapopulacional, indicando que as populações estudadas sofreram deriva genética. Da mesma forma, não há forte correlação entre a estruturação genética obtida pelo programa Structure e as localidades de coleta, exceto para as populações de São Simão e São Pedro de Viterbo e Piquerobi, cujos grupamentos formados são basicamente representados por indivíduos destas localidades. Portanto, embora preliminares, nossas observações indicam não haver correlação entre a estruturação genética observada e os fatores ambientais das localidades de coleta.

## Referências Bibliográficas

BARTON, N.H. and SLATKIN, M., A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. *Heredity* 56:409-415, 1986.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, v.32, p.314-331, 1980.

CARNEIRO, R. A. F. A produção de Biodiesel na Bahia. Disponível em: <[http://www.sei.ba.gov.br/publicacoes/bahia\\_analise](http://www.sei.ba.gov.br/publicacoes/bahia_analise)>. Acesso em: 15 mar. 2008.

CIPRIANO, R. Descobrindo o poder da macaúba. Disponível em: <[http://www.embrapa.br/noticias/banco\\_de\\_noticias/folder.2006/foldernoticia.2006-04-03.3722359657/noticia.2006-04-26.0919750710/mostra\\_noticia](http://www.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/folder.2006/foldernoticia.2006-04-03.3722359657/noticia.2006-04-26.0919750710/mostra_noticia)>. Acesso em: 15 mar. 2008.

COSTA NETO, P. R., et al. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*, v.23, p.531-537, 2000.

GOUDET, J. Fstat version 1.2: a computer program to calculate F statistics. *Journal of Heredity* 86, p. 485-486, 1995.

LEWIS, P.; ZAYKIN, D. Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data. (Software) 2000. Version 1.0 (d12). Disponível em: <<http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/>>. Acesso em: 24 mar. 2008.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Plantarum, Nova Odessa. 1992.

NUCCI SM, AZEVEDO-FILHO JA; COLOMBO CA; PRIOLLI RHG; COELHO RM; MATA TL and ZUCCHI MI. 2007. Development and characterization of microsatellites markers from the *Acrocomia aculeata*. *Molecular Ecology Notes*. No prelo.

PRITCHARD J.K., STEPHENS M., DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945-959, 2000.

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

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

TASSARO, H. Frutas no Brasil. São Paulo: Empresa das Artes, 1996.