



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA

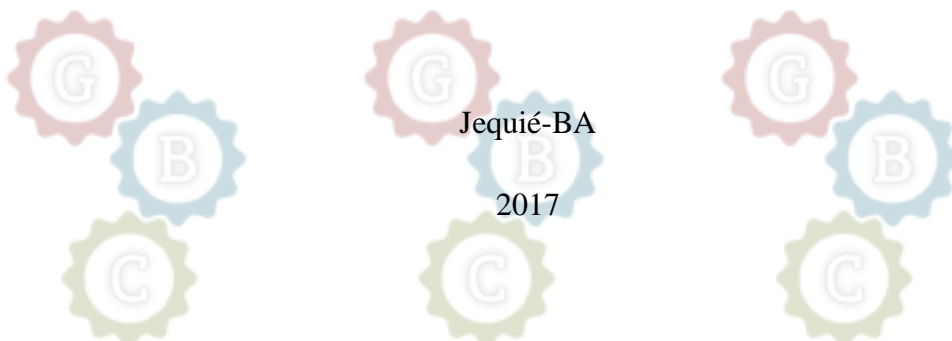
Pro **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E**  
Genética, Biodiversidade e Conservação

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Syagrus coronata***  
**(MART) BECC. (ARECACEAE)**



**RENATA RIBEIRO SIMPLICIO**

Programa de Pós-Graduação em **Genética, Biodiversidade e Conservação**



Jequié-BA

2017

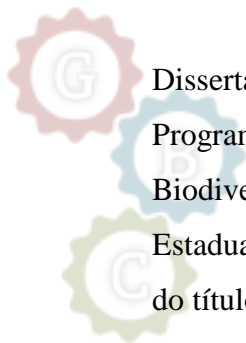
Programa de Pós-Graduação em **Genética, Biodiversidade e Conservação**



**RENATA RIBEIRO SIMPLICIO**

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Syagrus coronata*  
(MART) BECC. (ARECACEAE)**



Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, para obtenção do título de Mestre em Genética, Biodiversidade e Conservação.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Waldschmidt

Co-orientadores: Prof. Dr. Derval Gomes Pereira e Prof. Dr. Cássio van den Berg.



Jequié-BA

2017

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Diversidade genética em populações naturais de *Syagrus coronata* (MART) BECC. (ARECACEAE) / Renata Ribeiro Simplicio.- Jequié, 2017. 78f.

(Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação da Profa. Dra. Ana Maria Waldschmidt e coorientação do Prof. Dr. Derval Gomes Pereira e do Prof. Dr. Cássio van den Berg)

S621d Simplicio, Renata Ribeiro.

Diversidade genética em populações naturais de *Syagrus coronata* (MART) BECC. (ARECACEAE) / Renata Ribeiro Simplicio.- Jequié, 2017. 78f.

Rafaella Cância Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E  
CONSERVAÇÃO

Campus Jequié-BA

Genética

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO


**Título:** "Diversidade Genética em Populações Naturais de *Syngnatus coronatus* (Mart) Becc. (Arecaceae)".

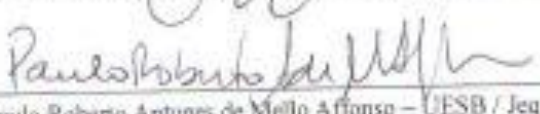
**Autor (a):** Renata Ribeiro Simplicio

**Orientador (a):** Profa. Dra. Ana Maria Waldschmidt

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, pela Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Maria Waldschmidt – UESB / Jequié-BA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Cassio van den Berg – UESB / Feira de Santana-BA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Roberto Antunes de Mello Afonso – UESB / Jequié-BA

Data de realização: 14 de agosto de 2017.

Avenida José Moreira Sobrinho, s/n – Jequié-BA – Jequié/BA – CEP 45.206-190.  
Telefones: (0\*\*73) 3528-9125 – E-mail: ppggbc@uesb.edu.br

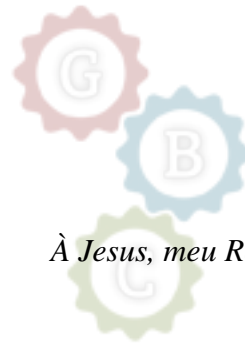
Genética



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



*À Jesus, meu Rei e Salvador!*

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



## AGRADECIMENTOS

A Deus por ser a minha fonte de amor e fortaleza.

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e o Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação (PPGGBC), pela estrutura concedida.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), pela licença de coleta concedida

A professora Dra. Ana Maria Waldschmidt por esses anos de orientações e ensinamentos. Exemplo marcante de profissionalismo e dedicação a pesquisa. De sensibilidade não só por seu objeto de estudo, mas por seu papel como professora-pesquisadora para a sociedade. Ao professor Dr. Derval Gomes Pereira por oportunizar meu primeiro estágio científico, o qual dirigiu minha vida acadêmica por um novo caminho. Me oportunizando ir além da vivência da licenciatura. Ao professor Dr. Cássio van den Berg por sua atenção e conhecimentos compartilhados.

Ao grupo de Biologia, Genética e Melhoramento Vegetal pelo companheirismo e ensinamentos. Agradeço também pelas risadas e auxílio nas expedições de coleta, que ficarão para sempre na minha memória. Lorena, Matheus, Gabriel e Sandra vocês são muito especiais para mim. Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular, escrevo esse agradecimento já com saudades dos longos dias com vocês. Vou guardar sempre a alegria de poder contar com pessoas as quais também torcem por um sucesso coletivo, por não ser exemplo de um ambiente hostil de trabalho. Não poderia deixar de citar Sâmela, Leyde, Jack, Lisi, Nathy, Rúbia e Ramon, por estarem sempre disponíveis a responder milhões de dúvidas diárias minhas.

Aos meus pais por todo incentivo e dedicação durante todos esses anos de estudo e vida. A minha avó Antônia e meu tio Vicente, vocês também fazem parte dessa conquista. A minha irmã a qual sacrificou muitas noites de descanso para que eu pudesse estudar. Ao meu esposo Heyder, por todo amor e incentivo. Por me tranquilizar quando achei que não conseguiria.

Meu muito obrigada!





## BIOGRAFIA

Renata Ribeiro Simplicio, filha de Eliene dos Santos Ribeiro e Francisco Lopes Simplicio, nasceu em 18 de Abril de 1992, em Jequié, Bahia. Cursou Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), no campus de Jequié, entre os anos de 2010 e 2014. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica pela FAPESB (2011-2013) e UESB (2013-2014) no Laboratório de Genética Molecular sob orientação do Prof. Dr. Derval Gomes Pereira e co-orientação da Profa. Dra. Ana Maria Waldschmidt. Ao fim da graduação em 2014 apresentou monografia intitulada: “Educação ambiental crítica: concepções e aprendizados dos licenciandos de ciências biológicas sobre a conservação da biodiversidade”. No ano seguinte ingressou no mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação (PPGGBC) na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), campus de Jequié, sob orientação da Profa. Dra. Ana Maria Waldschmidt e coorientação do Prof. Dr. Derval Gomes pereira e Prof. Dr. Cássio van den Berg, sendo bolsista FAPESB e desenvolvendo trabalho na área de Genética Molecular Vegetal.



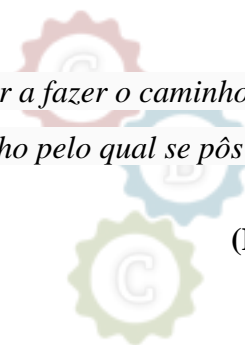
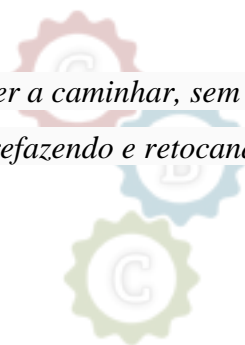
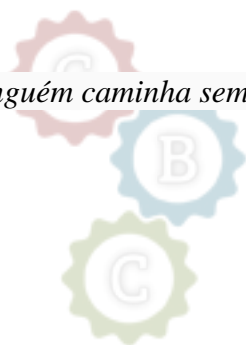
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

*“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a caminhar.”*

**(Paulo Freire)**



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação





## RESUMO

As palmeiras são importantes elementos na estrutura e funcionamento dos ecossistemas tropicais. *Syagrus coronata* é considerada uma espécie-chave para o semiárido, possui um contínuo período de frutificação e sua conservação implica na preservação de diversas espécies associadas. A espécie também fornece recursos como frutos, ceras, óleos e fibras a diversas atividades humanas. A contínua exploração desses recursos tem reduzido as populações naturais, somado aos efeitos da perda de habitat e fragmentação florestal devido ao uso excessivo da terra. Logo, as respostas adaptativas a sobrevivência das espécies estão diretamente ligadas à diversidade genética, e seus níveis também estão associados a áreas historicamente estáveis. O presente estudo teve como objetivo analisar a diversidade e estrutura genética em 22 populações naturais de *Syagrus coronata* através de marcadores SSR e ISSR, e investigar como as mudanças climáticas durante o Pleistoceno tardio influenciaram a história demográfica da espécie. A dissertação foi dividida em capítulos, sendo que no primeiro, diante a ausência de *loci* microssatélites para *Syagrus coronata*, testamos 19 *primers* heterólogos desenvolvidos para outras três espécies de palmeiras. Todos os *primers* SSR testados foram transferíveis para a espécie, sendo genotipados os dez *loci* mais polimórficos. Além do SSR, foram amplificados 10 *loci* ISSR. No segundo capítulo, os marcadores SSR revelaram alta diversidade genética ( $H_e=0,716$ ), e excesso de heterozigotos para todas as localidades ( $H_o=0,910$ ). Acreditamos que devido ao surgimento de novas mutações, diversas populações não estão em equilíbrio gênico. Níveis de estruturação genética consideráveis foram observados ( $\Phi_{ST}=0,140$   $p<0,01$ ), possivelmente consequente de efeitos da dispersão desigual de pólen e sementes. Ambos marcadores revelaram que as localidades (15, 16 e 17) no norte da Bahia estão mais estruturadas geneticamente, sendo consideradas como Unidades Evolutivamente Significativas (UES) para conservação. A modelagem climática histórica indicou expansão de áreas com estabilidade climática do Último Período Interglacial ao presente, permitindo a ampla distribuição e diversidade genética da espécie. Os resultados encontrados para a *Syagrus coronata* são importantes para o monitoramento das populações da espécie, e uma intervenção preventiva diante a intensa degradação ambiental e extrativismo sofrido por suas populações.

**Palavras-chave:** Licuri; marcadores moleculares; modelagem climática; variabilidade genética; conservação; extrativismo.



## ABSTRACT

Palm trees are important elements in the structure and functioning of tropical ecosystems. *Syagrus coronata* is considered a key species for the semi-arid, has a continuous period of fruiting and its conservation involves the preservation of several associated species. The species also provides resources such as fruits, waxes, oils and fibers to various human activities. The continued exploitation of these resources has reduced natural populations, coupled with the effects of habitat loss and forest fragmentation due to excessive land use. Thus, adaptive responses to species survival are directly linked to genetic diversity, and their levels are also associated with historically stable areas. The present study aimed to analyze the diversity and genetic structure of 22 natural populations of *Syagrus coronata* through SSR and ISSR markers, and to investigate how climatic changes during late Pleistocene influenced the demographic history of the species. The dissertation was divided into chapters, and in the first, due to the absence of microsatellite loci for *Syagrus coronata*, we tested 19 heterologous primers developed for three other palm species. All SSR primers tested were transferable to the species, the ten most polymorphic loci being genotyped. In addition to SSR, 10 ISSR loci were amplified. In the second chapter, SSR markers revealed high genetic diversity ( $H_e = 0.716$ ), and excess heterozygotes for all localities ( $H_o = 0.910$ ). We believe that due to the appearance of new mutations, several populations are not in gene balance. Considerable levels of genetic structuring were observed ( $\phi_{ST} = 0.140$   $p < 0.01$ ), possibly due to effects of uneven dispersion of pollen and seeds. Both markers revealed that the localities (15, 16 and 17) in the north of Bahia are more genetically structured, being considered as evolutionarily significant units (ESUs) for conservation. Historical climatic modeling has indicated the expansion of areas with climatic stability from the Late Interglacial Period to the present, allowing the wide distribution and genetic diversity of the species. The results found for *Syagrus coronata* are important for the monitoring of the populations of the species, and a preventive intervention in the face of the intense environmental degradation and extractivism suffered by its populations.

**Keywords:** Licuri; molecular markers; climatic modeling; genetic variability; conservation; extractivism.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Indivíduo da palmeira *Syagrus coronata* (Mart) Becc (Arecaceae) localizado no município de Brumado-BA.....17

### Capítulo 2

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

**Figura 1.** Mapa da área amostrada para *Syagrus coronata*.....48

**Figura 2.** Relação genética entre 22 populações naturais de *Syagrus coronata* (216 indivíduos) estimada por *Structure* com base em marcadores SSR (A) e ISSR (B). As linhas verticais indicam os espécimes e as cores representam as frequências alélicas.....56

**Figura 3.** Análise das Coordenadas Principais (PCA) em populações de *Syagrus coronata* baseada em *loci* SSR (A) e ISSR (B).....58

**Figura 4.** Dendrograma UPGMA gerado através de 22 populações de *Syagrus coronata* através de *loci* SSR baseados nas distâncias genéticas de Nei (1978) (A) e ISSR baseado nos índices de diferenciação genética entre populações  $F_{ST}$  (B).....59

**Figura 5.** Modelagem climática histórica da potencial distribuição da palmeira *Syagrus coronata* em diferentes períodos. Projeção Atual (A), sobreposição dos três modelos (CCSM4, MPI-ESM-P e MIROC-ESM) para Médio Holoceno (Mid-H) (B), Último Máximo Glacial (LGM) (C), e Último Interglacial (LIG) (D). Em (E) a potencial área de refúgio para a *Syagrus coronata*. As legendas indicam a adequabilidade climática para a ocorrência da espécie.....63

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

**Tabela 1.** Sequences of tested heterologous loci in *Syagrus coronata*, with their respective fragment size in bp and best annealing temperature (Ta).....39

**Tabela 2.** Genetic diversity parameters (number of alleles per loci -  $N_A$ ; expected heterozygosity -  $H_E$ ; and observed heterozygosity -  $H_O$ ) in *Syagrus coronata* based on 10 transferrable heterologous loci.....40

### Capítulo 2

**Tabela 1.** *Primers* heterólogos selecionados transferidos para *Syagrus coronata* ver (Simplicio et al. 2017).....50

**Tabela 2.** *Primers* ISSR selecionados para *Syagrus coronata* amplificados a 53 °C.....51

**Tabela 3.** Parâmetros genéticos referentes aos *loci* SSR e ISSR aplicados às 22 populações de *Syagrus coronata*.....53

**Tabela 4.** Análises referentes a estrutura populacional e divergência genética em 22 populações de *Syagrus coronata* baseadas em 10 *primers* SSR e 10 *primers* ISSR.....55

**Tabela 5.** Análises referentes à estrutura populacional e divergência genética dos agrupamentos revelados por meio da análise bayesiana.....56

**Tabela S1.** Localidades amostradas e suas respectivas informações geográficas e número amostral.....77



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
2.1 Considerações sobre a espécie <i>Syagrus coronata</i> (Mart) Becc (Arecaceae).....	16
2.2 Importância socioeconômica e ameaças as populações naturais de <i>Syagrus coronata</i> (Mart) Becc.....	19
2.3 Utilização dos marcadores <i>Simple Sequence Repeats</i> (SSR) na análise genética de espécies vegetais.....	20
2.4 Transferibilidade de loci SSR em espécies vegetais.....	22
2.5 O uso dos <i>Inter Simple Sequence Repeats</i> (ISSR), no diagnóstico genético em plantas.....	25
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
3.1 Objetivo Geral .....	26
3.2 Objetivos Específicos .....	26
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>27</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>5. CAPÍTULO 1: Transferability of microsatellite markers in <i>Syagrus coronata</i> (Mart) Becc. (Arecaceae), an iconic palm tree from the Brazilian semiarid region .....</b>	<b>36</b>
5.1 INTRODUCTION.....	37
5.2 MATERIAL AND METHODS .....	38
5.3 RESULTS.....	39
5.4 DISCUSSION .....	41
5.5 REFERENCES .....	42
<b>6. CAPÍTULO 2: Diversidade e estrutura genética em dispersão histórica de populações naturais de <i>Syagrus coronata</i> (Mart) Becc. (Arecaceae).....</b>	<b>45</b>
6.1 INTRODUÇÃO.....	46
6.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	48
6.2.1 Amostragem e Extração de DNA.....	48
6.2.2 Amplificação e Análise dos Marcadores Microsatélites.....	49
6.2.3 Amplificação e Análise dos Marcadores ISSR.....	51
6.2.4 Modelagem Climática Histórica.....	52
6.3 RESULTADOS .....	53

6.3.1 Diversidade genética dos <i>loci</i> SSR e ISSR.....	53
6.3.2 Estrutura populacional e divergência genética.....	54
6.3.3 Modelos de adequação e estabilidade climática.....	57
6.4 DISCUSSÃO .....	60
6.5 REFERÊNCIAS .....	69
<b>7. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>77</b>

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



## 1. INTRODUÇÃO

A insuficiência dos estudos realizados no semiárido com relação à diversidade e estrutura genética vegetal acentua o estado ameaçado deste ecossistema. A forma extrativista como a cultura local desenvolveu métodos de sobrevivência a partir dos meios naturais para fins próprios e comerciais vem ocasionando grande impacto sobre a biodiversidade do semiárido. Atualmente, diversos estudos populacionais têm enfatizado a importância da conservação da diversidade genética das populações naturais e que pode garantir maior valor adaptativo em meio às adversidades ambientais.

Muitas espécies de palmeiras têm se tornado alvo de exploração indiscriminada, havendo a priorização dos interesses econômicos e negligenciando aspectos ecológicos e genéticos associados às espécies. Nesse contexto, *Syagrus coronata*, conhecida popularmente como licuri, ouricuri, nicuri ou alicuri, tem ampla distribuição no semiárido e apresenta alto valor socioeconômico devido sua utilização integral na confecção de produtos que geram renda, principalmente para agricultura familiar.

O entendimento de como está distribuída a diversidade genética nas populações dessa espécie é crucial para gerir populações em declínio e propor programas de manejo adequados. Diante do exposto e, considerando a escassez de informações sobre a espécie *Syagrus coronata* esse estudo foi desenvolvido. A combinação de metodologias como marcadores moleculares e modelagem climática histórica pode contribuir, de forma significativa para a avaliação da distribuição da diversidade e estrutura genética das populações naturais. Permitindo diagnosticar a variabilidade dentro e entre as populações, fornecendo subsídio para projetos de conservação mais eficientes.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Considerações sobre a espécie *Syagrus coronata* (Mart) Becc (Arecaceae)

A família Arecaceae, anteriormente denominada Palmae, é constituída por espécies conhecidas como palmeiras, importantes na dinâmica e estrutura das florestas (Roncal *et al.* 2013). São denominadas como elementos-chave da estrutura e funcionamento dos ecossistemas tropicais (Lanes *et al.* 2016). Representam a terceira família botânica mais importante economicamente, apresentando cerca de 252 gêneros e mais de 2600 espécies, com cinco subfamílias (Arecoideae, Ceroxyloideae, Coryphoideae, Nypoideae e Calamoideae) (Dransfield *et al.* 2005).

Com distribuição pantropical, palmeiras adaptadas a locais com climas temperados são consideradas exceções, sendo distribuídas principalmente na região equatorial quente e úmida, ocupando diferentes habitats e estratos, compondo tanto sub-bosques e dosséis (Soares *et al.* 2014). As palmeiras são monocotiledôneas, conhecidas por serem angiospermas morfológicamente bastante diversas. São reconhecidas facilmente por seu crescimento arbóreo, a partir de tecido primário, constituindo o estipe. Diversas quanto ao hábito, apresentam folhas pinadas ou palmadas e suas inflorescências são numerosas e envolvidas por brácteas (Comer *et al.* 2016).

Um considerável acervo de fósseis evidencia que a abundância da família teve início há pelo menos 120 milhões de anos em ecossistemas tropicais e subtropicais (Eiserhardt *et al.* 2011). Os primeiros eventos de diversificação do grupo ocorreram durante o Cretáceo Médio no supercontinente Laurasia, entre o Paleoceno e Holoceno (65 a 54 milhões de anos atrás), coincidindo com um período de aquecimento global, de onde migraram para diversas regiões (Couvreur *et al.* 2011; Roncal *et al.* 2013). Ao final do Paleoceno, uma grande parte das linhagens de palmeiras já estava bem representada na América do Sul (Dransfield *et al.* 2008; Gomez-Navarro *et al.* 2009).

A subfamília Arecoideae é a maior e mais representativa da região neotropical que, durante um único evento de dispersão há 75 milhões de anos atrás, colonizou a América do Sul a partir da região Norte/Central (Roncal *et al.* 2013). Entre as tribos que compõem essa subfamília, a mais numerosa em espécies é a tribo Cocoseae, com cerca de 319 espécies. O gênero *Syagrus* pertence à tribo Cocoseae e composto por 53 espécies, das quais 36 são

endêmicas da América do Sul e 47 ocorrem no Brasil, com o maior centro de dispersão na região Nordeste, principalmente no estado da Bahia (Lorenzi *et al.* 2002). Dispersas em diversos biomas brasileiros, são monoicas e morfologicamente variáveis. As espécies desse gênero variam de pequeno a grande porte, com estipe elevado ou subterrâneo, liso ou com as cicatrizes das bainhas das folhas que já caíram. As espécies acaulescentes estão geralmente distribuídas por regiões áridas, enquanto as arbóreas estão comumente em regiões tropicais ou subtropicais úmidas. Diversas espécies do gênero detêm valor econômico e social, e conseqüentemente, várias espécies estão ameaçadas de extinção por sua forma extrativista de exploração (Noblick, 2010).

Dentre essas espécies, a *Syagrus coronata* (Mart) Becc (Figura 1) conhecida popularmente como licuri, ouricuri, uricuri ou ainda alicuri, se encontra entre as principais palmeiras de importância sócio-econômica. Sua distribuição compreende o norte de Minas Gerais até o sul de Pernambuco, abrangendo as porções central e oriental do estado da Bahia, bem como, os estados de Sergipe e de Alagoas (Noblick, 2010). Apresenta preferência pelas regiões áridas da Caatinga, onde ocorre a maior abrangência do licurizeiro (Ramalho, 2008). Suporta bem a grande amplitude na variação pluviométrica, e secas prolongadas nesse domínio morfoclimático (Duque, 2004).



**Figura 1.** Indivíduo da palmeira *Syagrus coronata* (Mart) Becc (Arecaceae) localizado no município de Brumado-BA.

O licuri possui altura que varia de 2 a 5 m, com folhas pinadas dispostas em cinco fileiras em espiral, que medem cerca de 3 m de comprimento, com estruturas semelhantes a espinhos na margem do pecíolo foliar. O estipe apresenta ainda cicatrizes características da espécie, provenientes da permanência da bainha das folhas antigas. Sua inflorescência possui inúmeras flores unissexuadas e amarelas, com perianto não evidente, do tipo interfoliar. As flores masculinas são longas e coriáceas contendo seis estames. Sendo as flores femininas relativamente mais curtas com ovário súpero e trilocular (Beltrão & Oliveira, 2007). A espécie floresce predominantemente entre os meses de maio e agosto, mas com contínua floração e produção de frutos ao longo do ano, os frutos amadurecem geralmente entre outubro e dezembro (Lorenzi, 2002).

Os frutos do licuri possuem uma variação de cor entre amarelo e laranja, dependente não só do tempo de amadurecimento como também das características genéticas do indivíduo. O endosperma solidifica durante o tempo de maturação, originando a amêndoa (Drumond, 2007). A composição nutricional do fruto apresenta elevado teor de lipídios (49,2%), merecendo destaque a quantidade de proteínas presente na amêndoa (11,5%), e a quantidade de carboidratos da polpa dos frutos (13,2%). A análise nutricional indica que o fruto do licuri é bastante energético (635,9 kcal.100 g<sup>-1</sup>) (Crepaldi *et al.* 2001).

Quanto à polinização e dispersão da *Syagrus coronata*, os principais visitantes florais da *S. coronata* são as abelhas *Trigona spinipes* e *Apis mellifera* (Apidae), como também o besouro *Microstrates ypsilon* (Curculionidae). Entre os principais agentes dispersores se encontram as aves, sendo a *Anodorhynchus leari* (arara-azul-de-lear) ave criticamente ameaçada a principal espécie associada à palmeira, como também pequenos mamíferos silvestres como *Dasyprocta sp.*, *Thrichomis sp.* e *Tayassu sp.*, e espécies domésticas de *Bos sp.*, *Capra sp.* e *Ovinis sp.* (Rocha, 2009). Com um longo período de vida, é de grande importância também para conservação da biodiversidade de epífitas na Caatinga. Cerca de 26 espécies de epífitas vasculares foram identificadas associadas ao licuri, pertencentes a 21 gêneros e 7 famílias (Oliveira *et al.* 2015). Dessa maneira, palmeiras como o licuri são espécies-chave nos ecossistemas por fornecem recursos às comunidades de frugívoros, polinizadores e epífitas associadas, e podem ter moldado a evolução das espécies dependentes durante o processo co-evolutivo (Eiserhardt *et al.* 2011).



## 2.2 Importância socio-econômica e ameaças às populações naturais de *Syagrus coronata* (Mart.) Becc.

As palmeiras fornecem diversos recursos às comunidades humanas como alimento, ceras, óleos e combustíveis, além da extração e uso das fibras para ornamentos, prática datada desde as comunidades de caçadores coletores (Isaza *et al.* 2013). A intensa e contínua exploração desses recursos têm tornado vulneráveis as populações naturais, que somando aos efeitos da redução populacional devido a fragmentação florestal e mudanças climáticas, podem levar a extinções locais. Assim, respostas adaptativas a sobrevivência das espécies estão diretamente ligadas à variação genética das populações. No entanto, a distribuição da diversidade genética nas populações de licuri ainda é desconhecida, ameaçando não só recursos ecológicos como também econômicos da espécie (Schueler *et al.* 2013).

O licuri, bem adaptado ao semiárido brasileiro, cresce em solos pobres e não requer altas taxas de precipitação como a maioria das palmeiras de regiões tropicais, sendo importante economicamente para as comunidades humanas dessa região. Apresentando um grande potencial paisagístico e forrageiro, seus frutos altamente energéticos são historicamente citados por seu potencial alimentício, salientando a importância do manejo das populações naturais, visto que a espécie apresenta limitações para a agricultura (Ramalho, 2008). Essa palmeira possui folhas grossas e coriáceas sendo uma fonte comercial de cera, utilizada na produção industrial de sabão. A extração de óleo de licuri começou a ser explorada em larga escala por volta de 1915. O óleo possui cor amarelada, e um ponto de fusão mais baixo (21 °C) que o comum extraído de *Cocos nucifera* (Balick, 1979). Por isso, o licuri é foco de estudos com relação ao seu potencial na produção de biodiesel. Estudos comprovam que o óleo extraído dos frutos apresenta qualidades físico-químicas adequadas para o seu uso como biocombustível (Salles *et al.* 2010; Iha *et al.* 2014).

Devido ao seu total aproveitamento, o licuri é explorado em larga escala de forma extrativista desde os tempos coloniais, levando à redução ou destruição das populações naturais (Drumond, 2007), a exemplo das populações quase extintas no município de Águas Belas no sertão de Pernambuco (Silva *et al.* 2006). Diante dessa situação, a normativa do IBAMA de N° 191, em vigor desde 24 de setembro de 2008, proibiu o corte da palmeira nas áreas de ocorrência natural. Com base nas recomendações da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) de 1996, que enfatizou a importância do manejo sustentável e conservação da espécie perante o intenso extrativismo (IBAMA, 2008). Atualmente,

informações para manejo e conservação do licuri estão reunidas em dois materiais disponíveis eletronicamente. A cartilha “Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do Licuri” apresenta linguagem simplificada, reunindo informações taxonômicas, ecológicas, agronômicas e de manejo da espécie e é direcionada principalmente às comunidades que dependem economicamente do licuri, como as cooperativas (Arroucha & Arroucha, 2013). Outro material disponível é o “Plano de ação nacional para a conservação da arara-azul-de-lear (*Anodorhynchus leari*)”, ave que se alimenta quase exclusivamente dos frutos de licuri. Nela relata-se que apenas as populações que estão associadas às áreas de ocorrência da arara-azul-de-lear recebem devida proteção, à exemplo da Estação Ecológica Raso da Catarina e a Área de Proteção Ambiental Serra Branca, situadas respectivamente nas cidades de Paulo Afonso e Jeremoabo no estado da Bahia (Lugarini *et al.* 2012).

O licuri já foi estudado quanto à sua estrutura e disposição espacial na paisagem (Ramalho, 2008), epífitas associadas (Oliveira *et al.* 2015), constituição nutricional (Crepaldi *et al.* 2001), agentes polinizadores e dispersores (Rocha, 2009), e potencialidade para biodiesel (Beltrão & Oliveira, 2007). Porém, não existem estudos moleculares sobre suas populações naturais e nem de como está distribuída a diversidade genética ao longo da área de ocorrência da espécie. Esses dados poderão ser utilizados para subsidiar ações de proteção, manejo e uso sustentável da *S. coronata*.

### 2.3 Utilização dos marcadores *Simple Sequence Repeats* (SSR) na análise genética de espécies vegetais

O grau de diversidade genética presente em populações naturais de espécies vegetais é foco de investigação desde o início do século XX. A diversidade genética é resultante, principalmente, de forças evolutivas como mutação e recombinação genética (Cavalli, 2003). O fluxo gênico entre as populações é o mecanismo que reduz a fixação de alelos deletérios nas mesmas, promovendo novas combinações alélicas, gerando polimorfismos e aumentando a diversidade genética (Frankham *et al.* 2008). Desse modo, o entendimento do fluxo gênico entre as populações é crucial por influenciar nas respostas adaptativas das espécies à pressão aos fatores evolutivos sobre populações locais. Assim, ao conhecer como a diversidade genética está distribuída entre as populações de uma espécie, é possível descrever prováveis riscos de extinções locais e consequentes efeitos sobre os processos ecológicos e evolutivos, contribuindo para efetivos planos de manejo e conservação de espécies (Balloux & Lugon-Moulin, 2002).



Até meados da década de 1960 se utilizavam genes ligados a características morfológicas como instrumentos de análise genética. Mas, somente com o avanço, na década de 1980, dos métodos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foi possível desenvolver um grande número de marcadores moleculares com padrões de marcas no genoma altamente polimórficas (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Dentre as classes de marcadores moleculares baseados em PCR os *Simple Sequence Repeats* (SSR), ou *Short Tandem Repeats* (STR), conhecidos como microssatélites, são ferramentas eficientes e amplamente utilizados na avaliação genética de populações de espécies vegetais (Oliveira *et al.* 2006).

Os microssatélites são regiões altamente repetitivas e polimórficas no genoma, compostos por sequências curtas de dois a cinco pares de bases (pb) repetidas em tandem amplificados por meio de *primers* compostos por 20 a 25 pb, que flanqueiam regiões específicas de microssatélites. Essas regiões apresentam tipos de repetições que podem ser di-, tri- ou tetranucleotídeos (Faleiro, 2007). Apresentam uma taxa de mutação estimada em  $10^{-3}$ , que pode variar entre os grupos taxonômicos (Balloux & Lugon-Moulin, 2002, Xia *et al.* 2014). Os microssatélites são, ainda, classificados como codominantes, por permitirem a discriminação de alelos homozigotos de heterozigotos para determinado *locus* em indivíduos diploides. Necessitam de pequenas quantidades de DNA molde para as reações de PCR. Tais vantagens tornaram os SSRs marcadores moleculares amplamente utilizados em diversos estudos genéticos de espécies vegetais e animais (Oosterhout *et al.* 2004).

Os microssatélites são importantes para a estimativa das frequências alélicas e distâncias genéticas, parâmetros essenciais em estudos de genética de populações (Escudero *et al.* 2003). O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) dos microssatélites têm contribuído para responder questões sobre fluxo gênico, juntamente com o auxílio de estimativas de diferenciação de populações. Os microssatélites vêm elucidando a influência de barreiras geográficas, sistemas de acasalamento, e capacidade de dispersão das espécies que, geralmente não acompanha sua amplitude geográfica, influenciando na distribuição da diversidade genética das populações (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). Ocorrem em até 50 regiões não traduzidas (UTRs), e estudos recentes relatam a importância dos microssatélites associados a regiões codificantes dos genomas eucarióticos, derivados de transcriptomas. Essas regiões controlam funções de transcrição e tradução, resultando em perda ou ganho de funções biológicas. Elas auxiliam também na seleção de recursos genéticos, reprodução de cultivares, e mapeamento de loci de traços quantitativos (Xia *et al.* 2014).

Em relação à família Arecaceae, os estudos mostram a eficácia dos microssatélites em diversas vertentes tais como: na verificação de desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg em palmeiras endêmicas de ilhas oceânicas como a *Livistona chinensis* (Jacq.) R.Br. ex Mart. var. *boninensis* (Ohtani *et al.* 2009); na avaliação da diversidade genética de espécies restritas a pequenas áreas que não estão em declínio, mas são sensíveis as mudanças climáticas, como a *Livistona carinensis* (Chiov.), revelando moderados valores de diversidade genética (Shapcott *et al.* 2009); na diagnose genética de espécies criticamente ameaçadas e em rápido declínio como a *Voanioala gerardii* J. Dransf. e *Lemurophoenix halleuxii* J. Dransf., revelando baixa diversidade genética, permitindo a seleção de populações prioritárias a conservação, que não recebiam a devida proteção (Shapcott *et al.* 2012 b); avaliação dos efeitos da fragmentação em uma escala de paisagem sobre a diversidade e estrutura genética das populações em remanescentes florestais, revelando baixa estruturação genética para espécies de palmeiras como a *Euterpe edulis* Mart. (Santos *et al.* 2015 a). Os microssatélites indicaram alta estruturação genética para populações de *Attalea vitrivir* Zona, devido à perda de habitat que tem afetado os processos microevolutivos e reduzido a diversidade genética da espécie (Santos *et al.* 2015 b). Esses marcadores tem contribuído também na identificação de sistemas mistos de acasalamento, como a predominância de autocruzamento na espécie *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart. que conduziram ao aumento dos índices de endogamia na espécie (Abreu *et al.* 2012), e altos níveis de cruzamento endogâmico em espécies-chaves tropicais como a *Mauritia flexuosa* L.f. em uma escala espacial e geracional (Federman *et al.* 2014).

Assim, diante dos atuais dados de alterações de habitats o uso de marcadores moleculares altamente informativos como os microssatélites, é fundamental para a ampliação do conhecimento sobre a biodiversidade, e adequada proteção das espécies e organismos associados a elas (Frankham *et al.* 2008).

#### **2.4 Transferibilidade de loci SSR em espécies vegetais**

A ampla distribuição dos microssatélites e diversidade alélica no genoma de espécies vegetais favorecem a utilização dos *Simple Sequence Repeats* (SSRs) em análises populacionais e mapeamento genético (Acuña *et al.* 2014). Os microssatélites não se destacam somente por serem codominantes e polimórficos, mas pela alta reprodutibilidade e transferência de *loci* entre espécies próximas, devido à conservação das regiões de microssatélites entre os táxons (Zaki *et al.* 2012). A transferibilidade de *primers* consiste

basicamente na utilização de *loci* específicos em espécies relacionadas, geralmente pertencentes ao mesmo gênero, para as quais não existem informações genéticas, contornando a necessidade de conhecimento prévio do genoma da espécie a ser estudada para o desenvolvimento de *primers* microsatélites específicos (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Cota *et al.* 2012).

Com a necessidade de diagnósticos rápidos para tomada de decisão sobre a proteção de populações de espécies-chave e seleção de genótipos com maior representatividade genética, a transferibilidade de *loci* heterólogos tem sido uma alternativa viável para estudos populacionais em diversas famílias vegetais. Em termos de marcadores polimórficos a taxa de transferência entre os táxons é mais variável. Sendo maior que 40% em mamíferos, e alcançando em espécies vegetais sucesso de transferibilidade maior que 60% entre espécies de eudicotiledôneas e 40% entre espécies de monocotiledôneas. Com exceção à família Bromeliaceae, onde a transferência de *loci* é possível entre espécies de subfamílias diferentes, devido à baixa divergência genética (Barbará *et al.* 2007).

Entre exemplos disponíveis na literatura foram testados 120 *loci* SRR desenvolvidos previamente para espécies de arroz pertencentes ao gênero *Oryza* (Poaceae), em 21 variedades de bambu (Poaceae), com sucesso de 63,3% de transferência, (Chen *et al.* ;2010). Oliveira *et al.* (2013) testaram também a transferibilidade de 41 marcadores SSR de *Passiflora edulis* (Passifloraceae) para 11 espécies do gênero. Os resultados revelaram uma transferibilidade média de 68,8% em 10 espécies potenciais para a domesticação, com maior representatividade para o subgênero *Passiflora*. Giombine *et al.* (2014) testaram a transferibilidade de 140 *primers* SSR provenientes das seguintes espécies de palmeira, *Cocos nucifera*, *Bactris gasipaes* e *Euterpe edulis* para a *Syagrus romanzoffiana* (Arecaceae), e conseguiram transferir 13% dos *primers*. Acunã *et al.* (2014) avaliaram a taxa de transferibilidade de 12 *loci* microsatélites entre diferentes espécies de *Eucalyptus* (Myrtaceae) e obtiveram cerca de 92% de sucesso na transferibilidade cruzada. Tais *primers* estão situados em regiões genômicas relacionadas ao controle gênico da qualidade da madeira. Zhou *et al.* (2016) testaram a transferibilidade de 112 *primers* polimórficos desenvolvidos para *Elymus sibiricus* (Triticeae), para outras 13 espécies do mesmo gênero, alcançando uma média de transferibilidade de 49%.

Atualmente as pesquisas na área da ecologia molecular tem exigido marcadores genéticos "universais" que podem ser facilmente transferidos entre espécies (Barbará *et al.* 2007). Diversos estudos com espécies vegetais seguem aproveitando a versatilidade da



transferibilidade de *loci* microssatélites para a avaliação de polimorfismo genético. Contornando a demanda de tempo e custo exigidos para o desenvolvimento de *primers* específicos, e contribuindo de forma significativa em projetos de conservação da biodiversidade (Gürcan & Mehlenbacher, 2010).

## 2.5 O uso dos *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) no diagnóstico genético em plantas

Novas técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) surgiram durante a década de 80. No final dos anos 90, diversos artigos relataram a utilidade de marcadores dominantes, os quais sendo arbitrários são vantajosos por dispensarem o uso de informações prévias no desenvolvimento de *primers* específicos. Estes geram uma grande quantidade de *loci* para estimativas de diversidade e estrutura genética em populações de diversos táxons vegetais e animais (Ramp *et al.* 2006).

Entre os marcadores dominantes se destacaram o *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), que são regiões amplificadas arbitrariamente por meio de dois *primers* contíguos com cerca de 10 nucleotídeos, contendo entre 50 e 70% de Guanina e Citosina. Devido ao seu curto comprimento aumenta-se a chance de amplificação dos fragmentos aleatórios no genoma das espécies. O *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), são fragmentos com cerca de 80 a 500 pb obtidos por reações com enzimas de restrição e posterior ligação de oligonucleotídeos adaptadores e amplificação seletiva por PCR (Faleiro *et al.* 2007). Entretanto, tais marcadores moleculares diferem em termos de custo, velocidade, demanda técnica, e grau de polimorfismo (Costa *et al.* 2016).

Os *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) foram desenvolvidos em 1994 e se destacaram por apresentar diversas vantagens sobre as demais técnicas (Zietkiewicz *et al.* 1994; Godwin *et al.* 1997). Situados entre as regiões de microssatélites, os ISSRs são regiões com 100-3000 pb dispersos amplamente no genoma de eucariotos, que variam em número de unidades de bases repetidas (di, tri, tetra ou pentanucleotídeos). Geralmente são amplificados por *primers* únicos com cerca de 16-25 pb de comprimento, os quais devem ser ancorados com a terminação 5' para evitar anelamento dentro de regiões de repetições e produzir diferentes bandas para um único *locus*. Os *primers* ancorados devem possuir também alguns nucleotídeos degenerados seguidos da terminação 5', a fim de aumentar o número de *loci* amplificados (Reddy *et al.* 2002; Archibald *et al.* 2006). A visualização dos fragmentos produzidos se dá por eletroforese em gel de agarose corados com Brometo de Etídio ou

GelRed® (Matioli, 2001). Cada marca ou banda visualizada no gel está delimitada no genoma por duas sequências microssatélites, sendo citada como uma técnica dominante, onde não é possível diferenciar os *loci* quanto a serem heterozigotos ou homozigotos.

Os ISSRs necessitam de poucos nanogramas (ng) de DNA e são altamente polimórficos, superando os RAPDs na reprodutibilidade, através do uso de *primers* longos que evitam anelamento em regiões não complementares. Além de não ser necessário o conhecimento prévio de sequências do genoma, como para os marcadores codominantes, os *primers* podem ser testados em quaisquer espécies, expandido o conhecimento do componente genético da biodiversidade das suas populações (Bornet & Branchard, 2001).

A variação no tamanho dos fragmentos de ISSR gera estimativas da variação e estrutura da população, sendo utilizado com sucesso na análise da diversidade genética e identificação de barreiras ao fluxo gênico nos mais diversos taxa de plantas, tais como as espécies medicinais como *Physaria bellii* (Brassicaceae), *Dipsacus asperoides* (Caprifoliaceae) e *Maytenus truncata* (Celastraceae) de grande importância ecológica e socioeconômica (Kothera *et al.* 2007; Chen *et al.* 2014, Simplicio *et al.* 2015). Os ISSRs também são utilizados na caracterização molecular de genótipos selvagens, de espécies de gramíneas forrageiras e perenes como a *Dactylis glomerata* (Poaceae), para fins de melhoramento genético e conservação (Costa *et al.* 2016). Como também, de maneira combinada com marcadores plastidiais, na inferência de padrões de radiação adaptativa e relações filogenéticas entre espécies de gêneros como *Clermontia sp.* (Campanulaceae), com histórias evolutivas ainda não esclarecidas (Givnish *et al.* 2013).

Quanto à família Arecaceae, os estudos baseados em marcadores ISSR se concentram em determinadas espécies, a exemplo da palmeira *Phoenix dactylifera*, conhecida popularmente como tamareira. A espécie apresenta grande importância socioeconômica e está inserida fortemente na cultura alimentar na parte Oriental do planeta. Estudos atuais baseados em ISSR estimaram a diversidade genética ao longo do tempo em cultivares após micropropagação, avaliando os riscos da reprodução vegetativa para conservação (Kumar *et al.* 2010). Tais marcadores demonstraram ser também importantes para o entendimento das relações filogenéticas entre cultivares e suas origens geográficas na área de distribuição da tamareira no Egito e Síria, a fim de deterem controle na seleção de genótipos (Hussein *et al.* 2005; Haider *et al.* 2012). Assim, a utilização dos marcadores moleculares ISSR tem fornecido aos pesquisadores uma técnica relativamente barata em relação à outros marcadores

moleculares e estatisticamente robusta, apropriada para fornecer uma grande quantidade de dados em um curto período de tempo (Ramp *et al.* 2006).

Logo, ambos marcadores dominantes e co-dominantes, são adequados para avaliar geneticamente espécies sem estudos moleculares anteriores (Nybom, 2004). A *Syagrus coronata* apresenta-se como uma espécie perene com populações densas e amplamente distribuídas, sua conservação é primariamente importante por esta ser uma espécie-chave do semiárido, que apresenta dificuldades para o cultivo. Assim, a manutenção de suas populações naturais deve ser o foco dos esforços de conservação, diante as reduções populacionais consequente do uso indevido da terra e ao extrativismo (Rocha, 2009). Seu estudo molecular se sustenta na tentativa de conhecer sua diversidade genética, e dispor informações de uma espécie antes que níveis críticos de sobrevivência sejam estabelecidos, fornecendo informações para o manejo e seleção de populações prioritárias em futuras decisões de conservação.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Analisar a diversidade e estrutura genética das populações naturais de *Syagrus coronata*, e como as mudanças climáticas durante o Pleistoceno tardio influenciaram a história demográfica das populações da espécie.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Testar a transferabilidade de *loci* microsatélites desenvolvidos para três espécies de palmeiras *Cocos nucifera* L. (Arecaceae), *Bactris gasipaes* Kunth (Arecaceae) e *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae) para populações naturais de *Syagrus coronata*;
- Avaliar a diversidade e estrutura genética das populações por meio de marcadores SSR e ISSR;
- Verificar como as mudanças climáticas durante o Pleistoceno tardio influenciaram a história demográfica das populações naturais
- Fornecer dados para a conservação e manejo sustentável das populações naturais de *Syagrus coronata*.



## Referências Bibliográficas

ABREU, AG.; PRIOLLI, RHGP.; AZEVEDO-FILHO, JA.; NUCCI, SM.; ZUCCHI, MI.; COELHO, RM. & COLOMBO, CA. 2012. The genetic structure and mating system of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Genetics and Molecular Biology*, vol. 35, no. 1, p. 119-121.

ACUÑA, CV.; VILLALBA, P.; HOPP, HE. & POLTRI, SNM. 2014. Transferability of microsatellite markers located in candidate genes for wood properties between *Eucalyptus* species. *Forest Systems*, vol. 23, no. 3, p. 506-512.

ARCHIBALD, JK.; MORT, ME.; CRAWFORD, DJ & SANTOS-GUERRA, A. 2006. Evolutionary relationships within recently radiated taxa: comments on methodology and analysis of inter- simple sequence repeat data and other hypervariable, dominant markers. *Taxon*, vol. 55, no. 3, p. 747-756.

AROUCHA, EPT. & AROUCHA ML. Boas Práticas de Manejo para o Extrativismo Sustentável do Licuri. Disponível em: <http://www.ispn.org.br/arquivos/licuri-WEB.pdf>. Acesso em 14 de fevereiro de 2017.

BALICK, MJ. 1979. Amazonian oil palms of promise: A survey. *Economic Botany*, vol. 33, p. 11-28.

BALLOUX, F. & LUGON-MOULIN, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, vol. 11, p. 155-165.

BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, GM.; BERED, F.; FAY, M.F. & LEXER, C. 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology*, vol. 16, p. 3759–3767.

BELTRÃO, N. & OLIVEIRA, M. Oleaginosas potenciais do Nordeste para a produção de biodiesel. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPA/21063/1/DOC177.pdf>. Acesso em 14 de fevereiro de 2017.

BORNET, B. & BRANCHARD, M. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*, vol. 19, p. 209-215.

CAVALLI, SB. & FREITAS, SS. 2003. Polimorfismos Moleculares. In: BERED, LB. *Genética e evolução vegetal*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, p. 200-250.

CHEN, DX.; LI, LY.; ZHANG, X.; WANG, Y. AND ZHANG<sup>1</sup>, Z. 2014. Genetic diversity and population structure of wild *Dipsacus asperoides* in China as indicated by ISSR markers. *Genetics and Molecular Research*, vol. 13, no. 3, p. 6340-6349.

CHEN, SY.; LIN, YT.; CHEN, CHW.; YANG, CH. & KU, HM. 2010. Transferability of rice SSR markers to bamboo. *Euphytica*, vol. 175, p. 23–33.

COMER, JR.; ZOMLEFER, WB.; BARRETT, CF.; STEVENSON, DW.; HEYDUK, K. & LEEBENS-MACK, JH. 2016. Nuclear phylogenomics of the palm subfamily Arecoideae (Arecaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 97, p. 32–42.

COSTA, R.; PEREIRA, G.; GARRIDO, I.; TAVARES-DE-SOUSA, MM. & ESPINOSA, F. 2016. Comparison of RAPD, ISSR, and AFLP Molecular Markers to Reveal and Classify Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) Germplasm Variations. 2016. *PLoS ONE*, vol. 11, no. 4. e0152972.

COTA, LG.; MOREIRA, PA.; MENEZES, EV.; GOMES AS.; ERICSSON, ARO.; OLIVEIRA, DA. & MELO JR, AF. 2012. Transferability and characterization of simple sequence repeat markers from *Anacardium occidentale* to *A. humile* (Anacardiaceae). *Genetics Molecular Research*, vol. 4, p. 4609-4616.

COUVREUR, TLP.; FOREST, F. & BAKER, WJ. 2011. Origin and global diversification patterns of tropical rain forests: inferences from a complete genus-level phylogeny of palms. *BMC Biology*, vol. 9, p. 44.

CREPALDI, IC.; MURADIAN, LB.; RIOS, MDG.; PENTEADO, MV. & SALATINO, A. 2001. Composição natural do fruto do licuri (*Syagrus Coronata* (Martius) Beccari). Revista Brasileira de Botânica, vol. 24, no. 2, p. 155-159.

DRANSFIELD, J.; UHL, NW.; ASMUSSEN, CB.; BAKER, WJ.; HARLEY, MM. & LEWIS, CE. 2005. A new phylogenetic classification of the palm family, Arecaceae. Kew Bulletin, vol. 60, p. 559-569.

DRUMOND, M.A. Licuri *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. Disponível em: [http://www.cpatsa.embrapa.br/public\\_eletronica/downloads/SDC199.pdf](http://www.cpatsa.embrapa.br/public_eletronica/downloads/SDC199.pdf). Acesso em 14 de fevereiro de 2017.

DUQUE, J.G. O Nordeste e as lavouras xerófilas. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/23261/1/livro1-O-Nordeste-e-as-Lavouras-Xerofilas.pdf>. Acesso em 14 de fevereiro de 2017.

EISERHARDT, WL.; SVENNING, JC.; KISSLING, WD. & BALSLEV, H. 2011. Geographical ecology of the palms (Arecaceae): determinants of diversity and distributions across spatial scale. Annals of Botany, vol. 1, p. 1-26.

ESCUDEIRO, A.; IRIONDO, JM. & TORRES, ME. 2003. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. Biological Conservation, vol. 113, no. 3, p. 351-365.

FALEIRO, FG. 2007. Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. 1ª ed. Distrito Federal: Embrapa Cerrados, 102 p.

FEDERMAN, S.; HYSENI, C.; CLEMENT, W.; OATHAM, MP. & CACCONE, A. 2014. Habitat fragmentation and the genetic structure of the Amazonian palm *Mauritia flexuosa* L.f. (Arecaceae) on the island of Trinidad. Conservation Genetics, vol. 15, no. 1, p. 355-362.

FERREIRA, ME. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220 p.

FRANKHAM, R.; BALLOU, JD.; BRISCOE, DA. & MCLNNES, K. 2008. Fundamentos de Genética da Conservação. 1ª ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 280 p.

GIOMBINI MI.; TOSTO DS.; & BRAVO SP. 2012. Characterization of 20 microsatellites in the Neotropical palm *Syagrus romanzoffiana* (Arecaceae) identified by cross-amplification from across genera. *Molecular Ecology Resources*, vol. 12, p. 1196–1197.

GIVNISH, TJ.; BEAN, GJ.; AMES, M.; LYON, SP. & SYTSMA, KJ. 2013. Phylogeny, Floral Evolution, and Inter-Island Dispersal in Hawaiian Clermontia (Campanulaceae) Based on ISSR Variation and Plastid Spacer Sequences. *PLoS ONE*, vol. 8, no. 5, e62566. doi:10.1371/journal.pone.0062566.

GODWIN, ID.; AITKEN, EAB. & SMITH, LW. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR), markers to plant genetics. *Electrophoresis*, vol. 18, p. 1524-1528.

GOMEZ-NAVARRO, C.; JARAMILLO, C.; HERRERA, F.; WING, SL. & CALLEJAS, R. 2009. Palms (Arecaceae) from a Paleocene rainforest of northern Colombia. *American Journal of Botany*, vol. 96, no. 1, p. 1300–1312.

GÜRCAN, K. & MEHLENBACHER, SA. 2010. Transferability of Microsatellite Markers in the Betulaceae. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, vol. 135, no. 2, p. 159–173.

HAIDER, N.; NABULSI, I. & MIR ALI, N. 2012. Phylogenetic relationships among date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars in Syria using RAPD and ISSR markers. *Journal Of Plant Biology Research*, vol. 1, p. 12-24.

HUSSEIN, EHA.; ADAWY, SS.; ISMAIL, SEME. & EL-ITRIBY, HA. 2005. Molecular characterization of some Egyptian date palm germoplasm using RAPD and ISSR markers. *Arab journal of biotechnology*, vol. 8, p. 83-98.

IHA OK.; ALVES FCSC.; SUAREZ PAZ.; OLIVEIRA MBF.; MENEGHETTI SMP.; SANTOS BPT & SOLETTI JI. 2014. Physicochemical properties of *Syagrus coronata* and



*Acrocomia aculeata* oils for biofuel production. *Industrial Crops and Products*, vol. 62, p. 318-322.

ISAZA C.; BERNAL R. & HOWARD P. 2013. Use, Production and Conservation of Palm Fiber in South America: A Review. *Journal of Human Ecology*, vol. 42, p. 69-93.

## Genética

## ação

KOTHERA, L.; RICHARDS, CM. & CARNEY, SE. 2007. Genetic diversity and structure in the rare Colorado endemic plant *Physaria bellii* Mulligan (Brassicaceae). *Conservation Genetics*, vol. 8, p. 1043–1050.

KUMAR, N.; MODI, AR.; SINGH, AM.; GAJERA, BB.; PATEL, AR.; PATEL, MP. & SUBHASH, N. 2010. Assessment of genetic fidelity of micropropagated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants by RAPD and ISSR markers assay. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, vol. 16, no. 2, p. 1-7.

LANES, ECM.; MOTOIKE, SY.; KUKIKN, C. & FREITAS, RD. 2015. Molecular Characterization and Population Structure of the Macaw Palm, *Acrocomia aculeata* (Arecaceae), *Ex Situ* Germplasm Collection Using Microsatellites Markers. *Journal of Heredity*, vol. 1, pag. 102–112.

LORENZI, H. 2002. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 4.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 368 p.

LUGARINI, C.; AEB, BARBOSA. & OLIVEIRA, KG. Plano de ação nacional para a conservação da arara-azul-de-lear. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-plano-de-acao/pan-arara-de-lear/pan-arara-azul-de-lear.pdf>. Acesso em 14 de fevereiro de 2017.

MATIOLI, SR. & BUENO, RS. 2001. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: MATIOLI, S.R. *Biologia Molecular e evolução*. Ribeirão Preto: Holos, 257 p.

MÔRO, J.; SILVA, MAS. & GERALDO, JS. 1999. Methodology for kariological study of brazilian palms. *Acta Horticulturae*, vol. 486, no.1, p. 225-228.

NOBLICK, LR. 2010. *Syagrus* Mart. In: LORENZI, H.; NOBLICK, LR.; KAHN, F.; FERREIRA, E. In: Flora Brasileira: Arecaceae (Palmeiras). Nova Odessa: Instituto Plantarum. p. 304-360.

OHTANI, M.; TANI, M. & YOSHIMARU, H. 2009. Isolation of polymorphic microsatellite loci in *Livistona chinensis* (Jacq.) R.Br. ex Mart. var. *boninensis* Becc., an endemic palm species of the oceanic Bonin Islands, Japan. *Conservation Genetics*, vol. 10, no. 1, p. 997–999.

OLIVEIRA UR.; SANTO FSE & ALVAREZ IA. 2015. Comunidade epifítica de *Syagrus coronata* (Mart.) becc. (Arecaceae) em áreas de pastagens na caatinga, Bahia. *Revista Caatinga*, vol. 28, p. 84- 91.

OLIVEIRA, EJ.; PÁDUA, GJ.; ZUCCHI, MI.; VENCOVSKY, R. & VIEIRA, MLC. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, vol. 29, no. 2, p. 294-307.

OLIVEIRA, GAF.; PÁDUA, JG.; COSTA, JL.; JESUS, ON.; CARVALHO, FM. & OLIVEIRA, EJ. 2013. Cross-species Amplification of Microsatellite Loci Developed for *Passiflora edulis* Sims. in Related *Passiflora* Species. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 56, no.5, p. 785-792.

OOSTERHOUT CV.; HUTCHINSON WF.; WILLS DPM. & SHIPLEY PF. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology*, vol. 4, p. 535-538.

RAMALHO, CI. 2008. Estrutura da vegetação e distribuição espacial do licuri *Syagrus Coronata* (Mart) Becc. em dois municípios do Centro Norte da Bahia, Brasil. Recife: Universidade Federal de Pernambuco. Dissertação de mestrado em Ciências Agrárias. 90 p.

RAMP, JM.; COLLINGE, SK. & RANKER, TA. 2006. Restoration genetics of the vernal pool endemic *Lasthenia conjugens* (Asteraceae). *Conservation Genetics*, vol. 7, p. 631–649.

REDDY, MP.; SARLA, N. & SIDDIQ, EA. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, vol. 1, p. 9-17.



ROCHA, KMR. 2009. Biologia reprodutiva da palmeira licuri (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc.) (ARECACEAE) na ecorregião do Raso da Catarina, Bahia. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco. Dissertação de Mestrado em Ciências Florestais. 98 p.

RONCAL, J.; KAHN, F.; MILLAN, B.; COUVREUR, TLP. & PINTAUD, J. 2013. Cenozoic colonization and diversification patterns of tropical American palms: evidence from *Astrocaryum* (Arecaceae). *Botanical Journal Linnean Society*, vol. 1, p. 120-139.

SALLES, KTSL.; MENEGHETTI, SMP.; SALLES, WFLS.; MENEGHETTI, MR.; SANTOS, ICF.; SILVA, JPV.; CARVALHO, SHV. & SOLETTI, JI. 2010. Characterization of *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. oil and properties of methyl esters for use as biodiesel. *Industrial Crops and Products*, vol. 32, p. 518-521.

SANTOS, AS.; CAZETTA, E.; MORANTE FILHO, JC.; BAUMGARTEN, J.; FARIA, D. & GAIOTTO, FA. 2015. Lessons from a palm: genetic diversity and structure in anthropogenic landscapes from Atlantic Forest, Brazil. *Conservation Genetics*, vol. 16, p. 1295–1302.

SANTOS, RRM.; CAVALLARI, MM.; PIMENTA1, MAS.; ABREU, AG.; COSTA, MR. & GUEDES, ML. 2015. Population genetic structure of *Attalea vitrivir* Zona (Arecaceae) in fragmented areas of southeast Brazil. *Genetics and Molecular Research*, vol. 14, p. 6472-6481.

SCHUELER, S.; KAPPELLER, S.; KONRAD, H.; GEBUREK, T.; MENGL, M.; BOZZANO, M.; KOSKELA, J.; LEFEVRE, F.; HUBERT, J.; KRAIGHER, H.; LONGAUER, R. & OLRİK, DC. 2013. Adaptive genetic diversity of trees for forest conservation in a future climate: a case study on Norway spruce in Austria. *Biodiversity Conservation*, vol. 22, p. 1151-1166.

SHAPCOTT, A.; DOWE, JL. & FORD, H. 2009. Low genetic diversity and recovery implications of the vulnerable Bankouale' Palm *Livistona carinensis* (Arecaceae), from North-eastern Africa and the Southern Arabian Peninsula. *Conservation Genetics*, vol. 10, p. 317–327.

SHAPCOTT, A.; HUTTON, I.; BAKER, WJ. & AULD, TD. 2012. Conservation genetics and ecology of an endemic montane palm on Lord Howe Island and its potential for resilience. *Conservation Genetics*, vol. 13, 257-270.

SILVA, VA.; ANDRADE LHC. & ALBUQUERQUE UP. 2006. Revising the Cultural Significance index: The Case of the Fulni-ô in Northeastern Brazil. *Field Methods*, vol. 18, p. 98-108.

SIMPLICIO, RR.; WALDSCHMIDT, AM.; AMORIM, MB.; ALMEIDA, BS. & PEREIRA, DG. 2015. Genetic diversity and structure in natural populations of *Maytenus truncata* Reiss, 1861, a medicinal plant vulnerable to extractivism in Bahia State, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, vol. 14, p. 18241-18248.

SOARES, KP.; LONGHI, SJ.; NETO, LW.; & ASSIS, LC. 2014. Palmeiras (Arecaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Rodriguésia*, vol. 65, no. 1, p. 113-139.

XIA, W.; XIAO, Y.; LIU, Z.; LUO, Z.; MASON, AS.; FAN, H.; YANG, Y.; ZHAO, S. & PENG, M. 2014. Development of gene-based simple sequence repeat markers for association analysis in *Cocos nucifera*. *Molecular Breeding*, vol. 34, p. 525–535.

ZAKI, NM.; SINGH, R.; ROSLI, R. & ISMAIL, I. 2012. *Elaeis oleifera* Genomic-SSR Markers: Exploitation in Oil Palm Germplasm Diversity and Cross-Amplification in Arecaceae. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 13, p. 4069-4088.

ZHOU, Q.; LUO, D.; MA, L.; XIE, W.; WANG, Y.; WANG, Y. & LIU, Z. 2016. Development and cross-species transferability of EST-SSR markers in Siberian wildrye (*Elymus sibiricus* L.) using Illumina sequencing. *Scientific Reports*, vol. 6, p. 20549.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A. & LABUDA, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, vol. 20, p. 176-183.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão dessa dissertação foram organizados na forma de capítulos. O primeiro já publicado pela revista *Genetics and Molecular Research (GMR)*, e o segundo será enviado à revista *Conservation Genetics*. Sendo assim, ambos encontram-se nas normas estabelecidas pelas revistas.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

**CAPÍTULO 1: Transferability of microsatellite markers in *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. (Arecaceae), an iconic palm tree from the Brazilian semiarid region**

R.R. Simplicio et al.

SSR markers in *Syagrus coronata*

R.R. Simplicio<sup>1</sup>, D.G. Pereira<sup>2</sup> and A.M. Waldschmidt<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, BA, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Química e Exatas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, BA, Brasil

Corresponding author: R.R. Simplicio

E-mail: [renatasimplicioesb@gmail.com](mailto:renatasimplicioesb@gmail.com)

**ABSTRACT**

The licuri palm *Syagrus coronata* plays a key role in the ecology and economy of Brazilian semiarid region. Nonetheless, genetic data about populations of this species are absent even though the intensive and uncontrolled exploitation since colonial periods has threatened the sustainability and viability of licuri populations. Therefore, we attempted to test the efficacy of transferability of microsatellite loci isolated from three palm tree species to *S. coronata* to analyze the population of this species throughout their range. A set of 19 heterologous microsatellite loci was tested in three native populations of *S. coronata* from the State of Bahia, northeastern Brazil, which amplified using distinct annealing temperatures (50°-60°C). Based on the 10 most polymorphic loci, the selected populations exhibited a mean number of alleles per locus of 9.8, and high genetic diversity values since the expected heterozygosity ranged from 0.573 to 0.754, while the observed heterozygosity varied from 0.785 to 1.000. In conclusion, the tested loci are transferrable and highly efficient to population studies in *S. coronata*, thus minimizing the lack of species-specific loci to the genetic monitoring of licuri populations.

**Key words:** Arecaceae; Caatinga; Conservation genetics; SSR



## INTRODUCTION

Several palm tree species have been widely exploited because of their useful resource to human communities; this is the case of the licuri palm *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. (Arecaceae), a species of biological and social-economic relevance in the semiarid region of Brazil, being widespread from the northern portion of the State of Minas Gerais, central and eastern parts of Bahia, Sergipe, Alagoas to southern Pernambuco (Drumond, 2007).

Because of their high energetic fruits and high resistance to drought periods, the licuri palm has been historically harvested as a food source. Therefore, the large-scale exploitation of this palm since colonial periods has reduced or extinguished populations along their original range. However, genetic studies in populations of the licuri palm are virtually unavailable, even though their spatial distribution in the semiarid landscape is well known and *S. coronata* has been a target of biofuel production (Ramalho, 2008).

In this sense, the simple sequence repeats (SSR) or microsatellites stand out as one of the most useful molecular markers to assess gene flow, genetic diversity, and population structure in vegetal species (Xiau et al., 2014). These codominant markers comprise highly polymorphic in tandem repeats (1 to 6 nucleotides) widespread throughout the genome of eukaryotes, particularly in non-coding regions. In the face of the fast-evolving environmental and economic crisis, efficient tools for the diagnosis of vulnerability status of species that play a key role in ecosystems, such as the licuri palm, should be developed. Since species-specific microsatellite markers in *S. coronata* are absent, the transferability of heterologous loci represents a viable alternative to infer gene flow among populations and the selection of priority areas for conserving genetic diversity and evolutionary potential of vulnerable species. Usually, the success of amplification using heterologous primers depends on previously reported data about related species (e.g., congeneric taxa) because of the occurrence of homologous microsatellite regions (Cota et al., 2012).

Therefore, the goal of the present study was to test the efficiency of transferability of SSR primers developed for three palm species - *Cocos nucifera* L. (Arecaceae), *Bactris gasipaes* Kunth (Arecaceae), and *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae) - for the amplification of microsatellite loci in *S. coronata* (Mart.) Becc. (Arecaceae). This result can be useful to further population genetic studies in the licuri palm, thus contributing to the genetic conservation and management of this species.

## MATERIAL AND METHODS

### Sampling

Samples of *S. coronata* were obtained from three municipalities in the State of Bahia, northeastern Brazil: Serrinha, Cocos, and Jequié. Each population was composed of 10 specimens, totaling 30 samples. A minimum distance of 10 m among individuals was adopted to collect samples within each locality. The inflorescences were deposited in the Herbarium at Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (HUESB).

### DNA extraction

About 100 g tissue from young leaves of *S. coronata* was used for the DNA extraction, following the protocol developed by Arruda (2014). The amount and integrity of extracted DNA were verified by electrophoresis on 0.8% agarose gel, stained with GelRed® and photodocumented under UV using the L-pix® system.

### Amplification and analysis of SSR loci

A set of 19 microsatellite primers previously developed for *C. nucifera* (Perera et al., 1999; Rivera et al., 1999), *B. gasipaes* (Billotte et al., 2004; Rodrigues et al., 2004), and *E. edulis* (Gaiotto et al., 2001) was tested in DNA samples of *S. coronata*. The amplification of SSR loci via PCR (polymerase chain reaction) was carried out according to Peters et al. (1998).

Each reaction comprised 1 µL 10X buffer (BioTools), 0.2 µL of each primer at 20 µM, 0.3 µL MgCl<sub>2</sub> at 50 mM, 0.4 µL dNTP at 2.5 mM, 5 U 0.1 µL Taq polymerase, 10 ng template DNA, and ultrapure water to a final volume of 10 µL. The PCR was performed using a thermocycler (Applied Biosystems) with the following program: an initial denaturation step at 94°C for 3 min, followed by 40 cycles of denaturation at 92°C for 30 s, annealing according to the tested temperature gradient (50°, 52°, 54°, 56°, 58°, and 60°C) for 1 min and extension at 72°C for 30 s, plus a final extension step at 72°C for 5 min.

The amplification products were genotyped using a MegaBace-1000 (GE Healthcare, Buckinghamshire) automated sequencer. The size of fragments was established based on genotyping peaks after comparison with the ET550R size marker in the MegaBace Fragment Profiler v. 2.2 software (GE Healthcare). A preliminary analysis was carried out to identify

and correct putative genotype errors using Micro-Checker v. 2.2.3 (Peakall and Smouse, 2012).

The 10 most polymorphic SSR loci amplified from the licuri palm were evaluated using the GenAlEx software (Peakall and Smouse, 2012) by estimating the expected ( $H_E$ ) and observed ( $H_O$ ) heterozygosity values, the number of alleles per locus ( $N_A$ ), and deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) for each primer per sampled population.

## RESULTS

The 19 tested loci were free of null alleles and properly amplified at distinct annealing temperatures, ranging from 50° to 60°C (Table 1). Among them, 10 markers were the most polymorphic ones and isolated from *C. nucifera* and *B. gasipaes*.

The genetic analysis of these 10 polymorphic loci in *S. coronata* revealed 5 to 12  $N_A$  and high levels of genetic diversity ( $H_E = 0.573-0.754$ ). Similarly, the  $H_O$  values varied from 0.785 to 1.000, being higher than the  $H_E$  (Table 2). Significant HWE deviation was observed for the loci CNZ50 and CNZ23 in the population from Cocos municipality ( $P < 0.001$ ), as well as for CNZ23, Bg02-09, and mBgCIR066 in samples from Jequié and CNZ50 in the population from Serrinha ( $P < 0.005$ ).

**Table 1.** Sequences of tested heterologous loci in *Syagrus coronata*, with their respective fragment size in bp and best annealing temperature (Ta).

Primers	Sequence (5'-3')	Fragment size	Ta (°C)
Bg02-09	F: CGCAGCAGCAGCAATAAATA R: TCCAGCAACTTTCAGTCGAG	170-174	60
Bg02-10	F: ATTGGGTCCAGATCCTCTTT R: GTGGCACACATGGGGTTC	150-176	52
CNZ03	F: CATCTTTCATCATTTAGCTCT R: AAACCAAAGCAAGGAGAAGT	132-140	60
CNZ04	F: CCTATTGCACCTAAGCAATTA R: TGATTTTCGAAGAGAGGTC	128-158	56
CNZ10	F: CCTATTGCACCTAAGCAATTA R: ATGATTTTCGAAGAGAGGTC	129-169	50
CNZ13	F: TATGCTATTCACTCATTTTTCG	138-178	60

	R: ACTCTGTTTCACGATCAAAAA		
CNZ23	F: ATCAAAACATGACACCGTAAC	133-163	58
	R: CTGATAGATGACAAGGTGTGG		
CNZ26	F: CTAGGCTCCCCATGTGTTTTT	216-240	58
	R: CACTGCTGTTGTACACCTCCA		
CNZ44	F: CATCAGTTCCTCTCATTTC	139-151	60
	R: CAACAAAAGACATAGGTGGTC		
CNZ50	F: TCGACTAAGTGTTGTCCATTC	114-120	54
	R: ATCCATCCAGGATCCCAATAT		
CNZ51	F: CTTTAGGGAAAAAGGACTGAG	138-150	60
	R: ATCCATGAGCTGAGCTTGAAC		
CNZ57	F: AGTGACAGCTCAAAGCAGTAT	99-105	50
	R: GTGGAGTACACAACCTATGGA		
CAC2	F: AGCTTTTTCATTGCTGGAAT	229-243	50
	R: CCCCTCCAATACATTTTTCC		
mBgCIR053	F: TTCAGTTAAGACCACCTATCA	148-176	56
	R: ACGAAGAAATCGAACCATAC		
mBgCIR058	F: TTTGATACCCCAGAGAGA	243-289	60
	R: AGCGAGAAACACGAATAC		
mBgCIR066	F: GCATGTTGCATTGACTA	253-257	54
	R: GAATCCTGGTTCAGATACT		
mBgCIR091	F: CAAGAACAGGCTCAGTCTA	200-212	60
	R: TGCAATCAACCCAAGAT		
EE41	F: CCTTGCAGTTTATGGCTACG	114-122	52
	R: CCATTGAGAGGGAATGAGGT		
EE54	F: CATGTATCTAAGGAACAAGG	113-115	60
	R: CTGTGCTCTCTCATTCTCA		

**Table 2.** Genetic diversity parameters (number of alleles per loci -  $N_A$ ; expected heterozygosity -  $H_E$ ; and observed heterozygosity -  $H_O$ ) in *Syagrus coronata* based on 10 transferrable heterologous loci.

Locus	$N_A$	$H_E$	$H_O$
mBgCI053	12	0.741	0.926



mBgCI066	10	0.697	0.911
Bg02-10	11	0.754	0.932
Bg02-09	12	0.752	0.833
CNZ03	9	0.748	0.785
CNZ23	12	0.753	0.969
CNZ44	8	0.704	1.000
CNZ50	10	0.721	0.923
CNZ51	5	0.573	0.836
CNZ57	9	0.722	0.989
Mean	9.8	0.716	0.910

## DISCUSSION

Because of the high species diversity and the costs of developing specific microsatellite markers, the transferability of heterologous primers is a suitable alternative to studies of population genetics in biodiversity hotspots (Barbará et al., 2007). This approach has been successfully used in both vegetal and animal groups, such as pollinators (Viana et al., 2011) and dispersers.

Indeed, the efficient transferability of the 19 tested SSR primers to amplify microsatellite loci in *S. coronata* corroborates the applicability of heterologous primers to genetic studies in palm trees, thus allowing refined population analysis in licuri palms. Among the heterologous primers amplified in *S. coronata*, 11 were originally developed for *C. nucifera* (Perera et al., 1999; Rivera et al., 1999). This result could be related to the close phylogenetic relationship between the genera *Syagrus* and *Cocos* within the subtribe Attaleinae, as revealed by the analysis of seven genes encoding specific transcription factors in plants (Meerow et al., 2009). Closely related species and transferability of SSR loci can be higher than 60% (Barbará et al., 2007).

Moreover, the 10 selected microsatellite loci showed high values of  $H_E$  (Table 2), indicating high genetic diversity that should be important to the maintenance and adaptability of natural populations. Nonetheless, some loci exhibited increased  $H_O$  values (near or equal to 1.0), such as CNZ23 ( $H_O = 0.923$ ) with significant deviation from HWE ( $P < 0.005$ ). Thus, in spite of the high values of genetic diversity, the deviation from HWE indicates the influence of distinct evolutionary forces, including the putative role of genetic drift by population fragmentation (Frankham et al., 2008), what should be further analyzed.

Similarly, the transferability of 31 SSR markers described for *Passiflora edulis* Sims and *Passiflora alata* Dryander (Passifloraceae) allowed evaluating the genetic diversity in *Passiflora setacea* D.C. with views to conservation and genetic improvement (Pereira et al., 2015). These authors also reported high values of  $H_0$  with the significant deviation ( $P < 0.01$ ) from HWE for all loci. Within *Citrus*, Cristofani-Yaly et al. (2011) obtained 100% efficiency in cross-species amplification using 24 SSR loci. These reports reinforce that genetic studies in species of great economic and ecological importance can benefit from the application of heterologous microsatellite primers.

Even though *S. coronata* is a key element to the biodiversity of caatinga, a threatened biome typical of the Brazilian semiarid region, little is known about its population structure. In fact, most genetic studies are focused on other palm species such as *Elaeis guineenses* Jacq. (Arecaceae) (Austin et al., 2015) and *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman (Arecaceae) (Giombinni et al., 2013). Therefore, the results from the present study provided a large number of microsatellite loci suitable for population studies in *S. coronata*. Based on the transferability of heterologous SSR primers, the levels of gene flow and genetic structure can be established in licuri palm populations, which are useful to the conservation and *in situ* or *ex situ* management of this iconic species from caatinga.

### Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to “Programa de Formação de Recursos Humanos - Petrobras” (#PRH-PB 211) and “Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia” (FAPESB) for the financial support and the scholarship on behalf of R.R. Simplicio, and to the Herbarium at Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (HUESB) for the assistance in species identification.

### REFERENCES

Arruda SR (2014). Diversidade e estrutura genética de *Mimosa tenuiflora* (Wild.) Poir.: Importante recurso florestal do semiárido brasileiro. Master’s thesis. UESB, Jequié.

Austin KG, Kasibhatla PS, Urban DL, Stolle F, et al. (2015). Reconciling Oil Palm Expansion and Climate Change Mitigation in Kalimantan, Indonesia. *PLoS One* 10: 0127963.

Barbará T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, et al. (2007). Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Mol. Ecol. Notes* 16: 3759-3767.

Billotte N, Couvreur T, Marseillac N, Brottier P, et al. (2004). A new set of microsatellite markers for the peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth); characterization and across-taxa utility within the tribe Cocoeae. *Mol. Ecol. Notes* 4:580-582.

Cota LG, Moreira PA, Menezes EV, Gomes AS, et al. (2012). Transferability and characterization of simple sequence repeat markers from *Anacardium occidentale* to *A. humile* (Anacardiaceae). *Genet. Mol. Res.* 4: 4609-4616.

Cristofani-Yaly M, Novelli VM, Bastianel M and Machado MA (2011). Transferability and Level of Heterozygosity of microsatellite Markers in *Citrus* Species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 29: 418-423.

Drumond MA (2007). Licuri *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. Petrolina. Embrapa Sêmi-Árido, Pernambuco.

Frakham R, Ballou JD and Briscoe DA (2008). Fundamentos da Genética da Conservação. Sociedade Brasileira de Genética, São Paulo.

Gaiotto FA, Brondani RPV and Grattapaglia D (2001). Microsatellite markers for Heart of Palm - *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart (Arecaceae). *Mol. Ecol. Notes* 1: 86-88.

Giombini MI, Tosto DS and Bravo SP (2013). Characterization of 20 microsatellites in the Neotropical palm *Syagrus romanzoffiana* (Arecaceae) identified by cross-amplification from across genera. *Mol. Ecol. Notes* 12: 1196-1197.

Meerow AW, Noblick L, Borrone JW, Couvreur TLP et al. (2009) Phylogenetic Analysis of Seven WRKY Genes across the Palm Subtribe Attaleinae (Arecaceae) Identifies *Syagrus* as Sister Group of the Coconut. *Plos One.* 4: 7353.

Peakall R and Smouse PE (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an up date. *Bioinformatic*. 28: 2537-2539.

Pereira DA, Gaiotto FA, Corrêa RX and Oliveira AC (2015). Heterologous primer transferability and access to microsatellite loci polymorphism in “somnus” passion fruit tree (*Passiflora setacea* DC). *Biotemas* 3: 51-56.

Perera L, Russell JR, Provan J and Powell W (1999). Identification and characterisation of microsatellites in coconut (*Cocos nucifera* L.) and the analysis of coconut populations in Sri Lanka. *Mol. Ecol. Notes* 8: 344-346.

Peters JM, Queller DC, Imperatriz-Fonseca VL and Strassmann JE (1998). Microsatellites loci for stingless bees. *Mol. Ecol.* 7: 783-792.

Ramalho CI (2008). Estrutura da vegetação e distribuição espacial do licuri *Syagrus coronata* (Mart) Becc. em dois municípios do Centro Norte da Bahia, Brasil. Universidade Federal de Pernambuco, Areia.

Rivera R, Edwards KJ, Barker JHA, Arnold GM, et al. (1999). Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in *Cocos nucifera* L. *Genome* 42: 668-675.

Rodrigues DP, Vinson C, Ciampi AY, Farias IP, et al. (2004). Novel microsatellite markers for *Bactris gasipaes* (Palmae). *Mol. Ecol. Notes* 4: 575-576.

Viana MVC, Miranda EA, De Francisco AK, Carvalho CAL, et al. (2011). Transferability of microsatellite primers developed for stingless bees to four other species of the genus *Melipona*. *Genet. Mol. Res.* 4: 3942-3947.

Xiao Y, Zhou L, Xia W, Mason AS, et al. (2014). Exploiting transcriptome data for the development and characterization of gene-based SSR markers related to cold tolerance in oil palm (*Elaeis guineensis*). *BMC Plant. Biol.* 4: 384-396.



**CAPÍTULO 2: Diversidade genética e dispersão histórica de populações naturais de *Syagrus coronata* (Mart) Becc. (Arecaceae)**

**Renata Ribeiro Simplicio<sup>1</sup> · Lorena Santos Silva<sup>2</sup> · Alessandra Santos Costa<sup>2</sup> · Cássio van den Berg<sup>3</sup> · Derval Gomes Pereira<sup>4</sup> · Ana Maria Waldschmidt<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação, Universidade Estadual de Sudoeste da Bahia, Rua José Moreira Sobrinho s/n, 45206-190 Jequié, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Sudoeste da Bahia, Rua José Moreira Sobrinho s/n, 45206-190 Jequié, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Avenida Transnordestina s/n, 44036900 Feira de Santana, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Química e Exatas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Rua José Moreira Sobrinho s/n, 45206-190 Jequié, Brasil

R.R. Simplicio

E-mail: renatasimplicioesb@gmail.com

**RESUMO**

A palmeira *Syagrus coronata* é considerada uma espécie-chave para o semiárido, além de fornecer frutos, ceras, óleos e fibras para diversas atividades humanas. O total aproveitamento desses recursos é realizado de forma extrativista e têm colocado em risco a sobrevivência das populações naturais. O entendimento de como as mudanças climáticas durante o Pleistoceno e como os impactos humanos atuais podem afetar a distribuição da diversidade genética são importantes informações em planos de manejo e conservação. Assim, combinamos diferentes marcadores moleculares a fim de avaliar a diversidade e estrutura genética atual de populações naturais da *Syagrus coronata*, e comparamos os padrões encontrados à adequabilidade climática histórica da espécie. Para isso, genotipamos dez *loci* microsatélites e amplificamos dez *primers* ISSR em 22 populações naturais de *Syagrus coronata*. Os marcadores SSR revelaram altos níveis de diversidade genética para espécie e apresentam níveis de estruturação genética consideráveis. A modelagem climática histórica indicou expansão de áreas com estabilidade climática do Último Período Interglacial ao presente. Compreendemos que os padrões de estabilidade climática histórica moldaram a distribuição genética e espacial da espécie. As populações mais representativas geneticamente estão localizadas no atual centro da distribuição, sobrepostas a locais de antigos e importantes

refúgios glaciais. Os dados reforçam a necessidade de mais estudos voltados aos ambientes áridos da região neotropical ainda pouco estudados.

**Palavras-chave** Arecaceae; Genética da conservação; Diversidade Genética; Palmeiras; Refúgios

## INTRODUÇÃO

As palmeiras pertencem à família Arecaceae e são consideradas espécies-chaves para os ecossistemas florestais por fornecerem recursos às comunidades de polinizadores e frugívoros, moldando a evolução das espécies co-dependentes (Eiserhardt et al. 2011). Devido à degradação, perda e fragmentação de seus habitats naturais, muitas espécies de palmeiras diminuíram drasticamente nos últimos séculos, levando a reduções severas no tamanho das populações ou à extinções locais (Ohtani et al. 2009).

A palmeira *Syagrus coronata* (Mart) Becc. (Arecaceae), está entre as principais espécies de importância socioeconômica do Brasil (Lorenzi et al. 2004). Apresenta ampla distribuição geográfica que compreende principalmente grande parte do semiárido brasileiro (Lorenzi et al. 2004), com grande concentração de populações em regiões de importantes refúgios glaciais (Bondar, 1938; Werneck et al. 2011). Utilizada desde os tempos coloniais na fabricação de artesanatos e produtos alimentícios, o intenso extrativismo tem dizimado as populações naturais, fato que conduziu à criação de uma normativa, que proibiu o corte desta espécie nas áreas de ocorrência natural (Campos et al. 2013).

Com a necessidade de conservação, a diversidade genética e história paleoclimática dessas espécies associadas aos ambientes áridos ainda são ignoradas mesmo com a alta biodiversidade e endemismos registrados nessas áreas (Miranda et al. 2016). Apesar do emergente interesse em estudos paleoclimáticos relacionados a florestas úmidas, o conhecimento para palmeiras distribuídas em ambientes xéricos é ainda incipiente (Guisan & Thuiller 2005). Logo, por meio de dados moleculares e modelagem climática histórica podemos fornecer *insights* importantes para o entendimento da distribuição atual da diversidade genética nas populações da palmeira *S. coronata*, e seus possíveis padrões de distribuição desde o Pleistoceno tardio. Dessa forma, contribuir para a conservação dessa espécie intensamente explorada, como também fornecer dados comparativos para ambientes áridos (Araújo et al. 2017).

Uma importante característica que distingue as palmeiras de outras espécies, está no contínuo período de frutificação (Rocha, 2009). O que permite a manutenção do fluxo gênico por meio da fecundação cruzada, mesmo em períodos de grande estiagem, gerando uma alta diversidade genética descrita para diversas espécies de palmeiras (Ohtani et al. 2009; Namoff et al. 2010; Nazareno & Reis 2014). Assim, se a sobrevivência das populações está diretamente condicionada aos níveis de diversidade genética encontrados (Kirk & Freeland 2010). Logo, nossa primeira hipótese explora os níveis e distribuição da diversidade genética da espécie e se estes refletem a exploração extrativista, comparativamente à outras espécies de palmeiras igualmente exploradas. Se o extrativismo foi alto suficiente para diminuir a diversidade genética, poderia haver devido às reduções populacionais uma considerável estrutura genética entre grupos de populações analisadas (Kahilainen et al. 2014).

Nossa segunda hipótese discute se as mudanças climáticas ocorridas durante o Pleistoceno tardio moldaram a demográfica histórica e diversidade genética nas populações de *Syagrus coronata*. Baseado na teoria dos refúgios, sugere-se que a estabilidade de grandes populações atuais e alta diversidade genética intraespecífica, está associada a áreas historicamente estáveis durante as mudanças climáticas (Werneck et al. 2011). Nós esperamos que os maiores níveis de diversidade genética de *S. coronata* devam está associados à áreas com estabilidade climática histórica, principalmente em áreas onde estão localizados potenciais refúgios glaciais. Para tal, através da modelagem climática histórica foram inferidas áreas com alta adequabilidade histórica e como essas podem ter influenciado a partição da diversidade genética das populações entre e dentro das populações de *S. coronata*. Nesse contexto, as palmeiras são um importante grupo modelo para entender os condutores da alta biodiversidade e demografia histórica das espécies tropicais por sua distribuição estar diretamente relacionada a variações na temperatura e precipitação (Goldel et al. 2015).

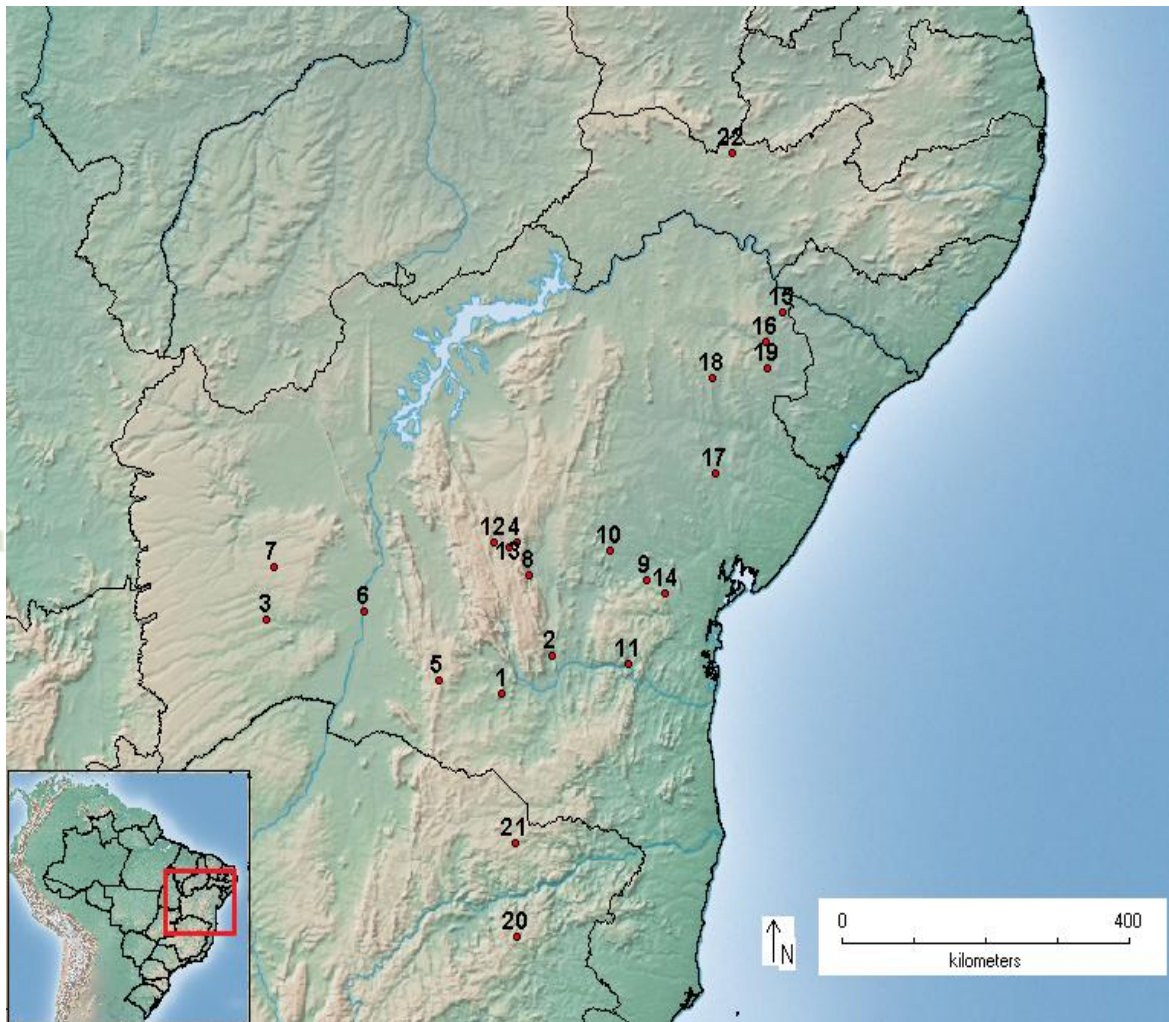
Assim, nesse estudo por meio de *loci* microssatélites realizamos análises genéticas populacionais, para compreender os padrões regionais de diversidade genética e fluxo gênico para as populações de *S. coronata*. Como também, análises de modelagem climática histórica afim de verificarmos se as mudanças climáticas ocorridas durante o Pleistoceno tardio influenciaram a história demográfica de suas populações atuais.



## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem e Extração de DNA

Foram amostrados 216 indivíduos de *Syagrus coronata* de 22 localidades, com base em transectos de norte ao sul e leste ao oeste, na região nordeste do Brasil (Tabela S1; Fig. 1). Respeitamos uma distância de 10 m entre cada indivíduo, a fim de evitar a coleta de indivíduos estreitamente relacionados. Amostras de inflorescência foram coletadas e depositadas no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (HUESB). O DNA foi isolado a partir de folhas jovens de *Syagrus coronata* seguindo o protocolo de Arruda et al. (2017).



**Fig. 1 .** Mapa da área amostrada para *Syagrus coronata*



## Amplificação e Análise dos Marcadores Microsatélites

Foram Amplificados dez *primers* heterólogos (Tabela 1), transferidos para *Syagrus coronata* (Simplicio et al. 2017). O mix com volume total de 10  $\mu$ L conteve: 0,1 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,2 M de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*), 1,5 M de  $MgCl_2$ , tampão a 1x, 1U de Taq DNA polimerase (Biotools) e 5-10 ng de DNA genômico. O mix foi incubado em termociclador (*Applied Biosystems*), com o seguinte programa de amplificação: desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguida por 40 ciclos – desnaturação a 92°C por 30 segundos, anelamento dos *primers* por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundos –com etapa extra de extensão a 72°C por 5 minutos. Os produtos da amplificação foram analisados após corridas realizadas em sequenciador automático MegaBace-1000 (GE Healthcare, Buckinghamshire). O tamanho dos fragmentos foi estabelecido pelos picos de genotipagem, por meio de comparações com o marcador de tamanho ET550R no software *MegaBace Fragment Profiler* versão 2.2 (GE Healthcare).

Foi realizada a correção de alelos nulos com uso do software MicroChecker v 2.2 (Oosterhout et al. 2004). Com o software GenAlEx (Peakall & Smouse 2012), foram calculados os seguintes índices de diversidade: Número de alelos por *primer* (NA), Número de alelos privados (AP), Percentual de *Loci* Polimórficos (PLP), Heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ). Foram verificadas quais populações estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), e foi realizada a Análise da Variância Molecular (AMOVA) em dois níveis hierárquicos, dentro e entre populações, com base no Índice de Fixação Genética ( $\phi_{ST}$ ) e o Coeficiente de Endogamia ( $F_{IS}$ ) segundo Wright (1948).

Executamos o modelo de agrupamento Bayesiano com o software STRUCTURE 2.2.3 (Falush et al. 2007). O número de populações K foi ajustado para variar de 1 a 22, com 10 interações. Foram usados Burn-in e MCMC (Cadeias de Markov de Monte Carlo) de  $10^6$  e  $10^5$  iterações respectivamente. Após ajustes do programa para marcadores codominantes, determinamos o modelo de mistura e assumimos que as frequências alélicas são correlacionadas entre as populações. Analisamos os resultados do Structure via Structure Harvester Web v.0.6.9 de acordo com os parâmetros de Evanno et al. (2005) para determinar o provável número de grupos. Com base nos grupos revelados, repetimos as seguintes análises para cada bloco de estruturação genética (AMOVA,  $\phi_{ST}$ , e teste de Mantel).

A partir da matriz de distância genética de Nei (1978), geramos um dendrograma de agrupamento pareado não-pareado (UPGMA) e um gráfico de Análises de Coordenadas Principais (PCA) por meio do software PAST (Hammer et al. 2001). Com o auxílio *do*

*Isolation By Distance Web Service* v. 3. 23 (Jensen et al. 2005), realizamos o teste de Mantel a fim de analisar se há correlação entre distância geográfica e distância genética.

**Tabela 1** Primers heterólogos selecionados transferidos para *Syagrus coronata* ver (Simplicio et al. 2017)

Locus	Sequências dos Primers	Tamanho dos fragmentos (bp)	Ta	NA
Bg02-09	F: CGCAGCAGCAGCAATAAATA R: TCCAGCAACTTTCAGTCGAG	108-150	60	12
Bg02-10	F: ATTGGGTCCAGATCCTCTTT R: GTGGCACACATGGGGTTC	109-150	52	11
CNZ03	F: CATCTTTCATCATTTAGCTCT R: AAACCAAAAGCAAGGAGAAGT	50-124	60	9
CNZ23	F: ATCAAAACATGACACCGTAAC R: CTGATAGATGACAAGGTGTGG	108-117	58	12
CNZ44	F: CATCAGTTCCACTCTCATTTC R: CAACAAAAGACATAGGTGGTC	106-120	60	7
CNZ50	F: TCGACTAAGTGTTGTCCATTC R: ATCCATCCAGGATCCCAATAT	112-120	54	9
CNZ51	F: CTTTAGGGAAAAGGACTGAG R: ATCCATGAGCTGAGCTTGAAC	55-125	60	5
CNZ57	F: AGTGACAGCTCAAAGCAGTAT R: GTGGAGTACACAACCTATGGA	107-195	50	8
mBgCIR053	F: GTTCAGTTAAGACCACCTATCA R: ACGAAGAAATCGAACCATAC	148-176	56	12
mBgCIR066	F: GCATGTTGCATTGACTA R: GAATCCTGGTTCAGATACT	108-112	50	6
<b>Total</b>				91

Ta (Temperatura de anelamento em °C), NA (Número de Alelos)

## Amplificação e Análise dos Marcadores ISSR

Amplificamos dez iniciadores ISSR da série UBC (WMED Representações LTDA) (Tabela 2), conforme a metodologia descrita por Zietjiewicz et al. (1994). O mix com volume total de 25  $\mu\text{L}$  consistiu em: 2,5 mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,1 mM de *primer*, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , tampão a 1x, 1U de Taq DNA polimerase e 5-10 ng de DNA genômico. O mix foi incubado em termociclador (*Applied Biosystems*), com o seguinte programa de amplificação: desnaturação inicial a 94 C por 3 min, seguida por 39 ciclos – desnaturação a 94 C por 1 min, anelamento final por 1 min a 53 C, extensão a 72 C por 2 min, mas extensão final a 72 C por 7 minutos. Analisamos os produtos de amplificação em eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE 1x, detectado por coloração com GelRed . Utilizamos o marcador de peso molecular de 1000 pb para determinar o tamanho dos fragmentos de ISSR.

Foi construída uma matriz binária e a partir desta estimamos a média de percentual de *loci* polimórficos (PLP) e a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) para cada população. Também foi estimada a variância molecular (AMOVA) entre e dentro das populações amostradas com base no  ndice de Fixa o Genética ( $\phi_{ST}$ ), por meio do software GenAlEx (Peakall & Smouse 2012). Com base na matriz de distâncias genéticas ( $F_{ST}$ ) geramos um dendrograma de agrupamento não-pareado (UPGMA) e um gráfico de Análises de Coordenadas Principais (PCO) através do software PAST (Hammer *et al.* 2001). Realizamos ainda análises Bayesianas e teste de Mantel, igualmente para os *loci* SSR.

**Tabela 2** *Primers* ISSR selecionados para *Syagrus coronata* e amplificados a 53  C

<i>Primers</i>	Sequência dos <i>Primers</i>	Número de <i>loci</i>
UBC 813	(CT) <sub>8</sub> T	17
UBC 815	(CT) <sub>8</sub> G	17
UBC 816	(CA) <sub>8</sub> T	14
UBC 822	(TC) <sub>8</sub> A	13
UBC 825	(AC) <sub>8</sub> T	13
UBC 827	(AC) <sub>8</sub> G	18
UBC 828	(TG) <sub>8</sub> A	13
UBC 861	(ACC) <sub>6</sub>	16

<b>UBC 866</b>	(CTC) <sub>6</sub>	15
<b>UBC 887</b>	DVD(TC) <sub>6</sub> CT	20
<b>Total</b>		156

Bases alternativas D (A, G, T), V (A, C, G)

### Modelagem Climática Histórica

A modelagem da potencial paleodistribuição da espécie durante os cenários climáticos foi realizada por meio do pacote “Biomod2” (Thuiller et al. 2016), a partir de 32 pontos de ocorrência, sendo 22 pontos amostrados neste estudo e 10 dados de ausência (Tabela S1).

Inicialmente, foi projetado o modelo da potencial atual área de distribuição de *S. coronata*. Em seguida, projetou-se o modelo em condições climáticas passadas a fim de entender a distribuição potencial da espécie em três períodos distintos datando o final do Quaternário: Médio - Holoceno (Mid-H) há cerca de 6.000 anos atrás, Último Máximo Glacial (LGM) à 21.000 anos e Último Interglacial (LIG) há 120.000 anos. As áreas de estabilidade foram estimadas a partir da interseção de todas as projeções (CCSM4, MPI-ESM-P e MIROC-ESM).

Dos 19 descritores bioclimáticos ambientais disponíveis em WorldClim ([www.worldclim.org](http://www.worldclim.org)), sete foram selecionados (Bio2, Bio4, Bio5, Bio13, Bio14, Bio15 e Bio18) a fim de melhor compreender a distribuição climática histórica da espécie. A área de refúgio para *Syagrus coronata*, foi estimada por meio da sobreposição de todos os modelos (CCSM4, MPI-ESM-P e MIROC-ESM) e períodos (Área atual de distribuição, Mid-H, LGM e LIG).

Por meio dos *loci* SSR e com uso do Bottleneck v.1.2.0.2 verificamos se houve estabilidade, gargalo ou expansão populacional. As corridas foram realizadas individualmente com as linhagens identificadas anteriormente e baseando-se nos modelos *Infinite Allele Model* (IAM) e *Stepwise Mutation Model* (SMM). A significância foi avaliada pelo teste de Wilcoxon com 10.000 repetições. Assumindo como premissa o déficit de heterozigotos significativo em populações em expansão e excesso de heterozigotos significativos em populações que sofreram gargalo.



## RESULTADOS

### Diversidade Genética dos *loci* SSR e ISSR

Os 10 *loci* SSR amplificados nas 22 populações de *S. coronata* produziram 91 alelos, com uma média de 9,1/*loci*, variando de 5 (CNZ51) a 12 (Bg02-09, CNZ23, mBgCI053) alelos por *primer*. Foram encontrados alelos privados em sete localidades amostradas no estado da Bahia (2,4, 5, 10, 11, 12 e 18). A Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) variou de 0,623 (22) a 0,782 (10), com uma média de 0,716 e a Heterozigosidade observada ( $H_o$ ) variou de 0,763 (2) a 0,990 (16), com uma média de 0,910 (Tabela 3).

Quanto ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), todas as populações apresentaram desvios significativos para, pelo menos, um *loci*, sendo que a população CDS (2) conteve desvios significativos em cinco *primers*, seguidas por COR (7) e AND (8) (quatro *primers* cada). Para este quesito, o *loci* CNZ23 foi o mais representativo entre as populações, apresentando desvios do EHW em 10 populações de *S. coronata* (3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 13 e 16).

Os dez *loci* ISSR geraram 156 *loci*, com uma média de 15,6 *loci* por *primer*, variando de 13 (UBC 822, 825 e 828) a 20 *loci* (UBC 887). Nestes foram observados 56,7% de *loci* polimórficos (PLP). O valor da Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) variou de 0,134 (4) a 0,260 (6), apresentando uma média de 0,197 (Tabela 3).

**Tabela 3** Parâmetros genéticos referentes aos *loci* SSR e ISSR aplicados às 22 populações de *Syagrus coronata*

Populações	Código	SSR					ISSR		
		$H_e$	IC	$H_o$	IC	PLP	$H_e$	IC	PLP
BRU	1	0,768	±0,032	0,876	±0,045	100	0,232	±0,017	62,18
CDS	2	0,686	±0,035	0,763	±0,075	100	0,249	±0,016	69,87
COC	3	0,776	±0,025	0,924	±0,029	100	0,236	±0,016	68,59
SJC	4	0,760	±0,028	0,976	±0,016	100	0,143	±0,016	40,38
CAE	5	0,736	±0,025	0,933	±0,034	100	0,221	±0,016	64,74
BJL	6	0,712	±0,028	0,899	±0,053	100	0,258	±0,016	71,79
COR	7	0,643	±0,071	0,797	±0,101	100	0,249	±0,016	71,79
AND	8	0,740	±0,023	0,890	±0,046	100	0,183	±0,016	53,75

MIL	9	0740	±0,026	0,968	±0,017	100	0,219	±0,016	61,64
ITA	10	0,782	±0,025	0,928	±0,025	100	0,231	±0,016	66,03
JEQ	11	0,708	±0,043	0,886	±0,052	100	0,188	±0,015	55,77
SEA	12	0,726	±0,026	0,952	±0,035	100	0,182	±0,016	50
PAL	13	0,695	±0,044	0,939	±0,031	100	0,189	±0,016	52,56
AMA	14	0,714	±0,038	0,881	±0,059	100	0,166	±0,016	46,79
STB	15	0,686	±0,023	0,979	±0,014	100	0,167	±0,015	53,21
JER	16	0,697	±0,022	0,990	±0,010	100	0,185	±0,016	55,13
SER	17	0,732	±0,036	0,929	±0,042	100	0,194	±0,016	55,77
EDC	18	0,695	±0,031	0,945	±0,032	100	0,194	±0,016	53,21
ANT	19	0,741	±0,022	0,901	±0,046	100	0,205	±0,016	59,62
PPA	20	0,662	±0,067	0,848	±0,091	100	0,122	±0,016	32,05
CDP	21	0,743	±0,022	0,893	±0,031	100	0,197	±0,017	54,49
SBM	22	0,623	±0,042	0,933	±0,051	100	0,180	±0,017	48,08
<b>Média</b>		0,716	±0,008	0,910	±0,011	100	0,200	±0,003	56,70

He (Diversidade genética de Nei (1973), Ho (Heterozigidade Observada), IC (Intervalo de Confiança), PLP (Percentual de *Loci* Polimórficos)

### Estrutura populacional e divergência genética

Referente aos *loci* SSR, a Análise da Variância Molecular (AMOVA) demonstrou que 91% da variação ocorre dentro das populações de *S. coronata*, enquanto apenas 9% está entre as 22 populações analisadas. O  $\phi_{ST}=0,140$  ( $p<0,01$ ) revelou uma moderada estruturação genética indicativo de pouca diferenciação e o  $F_{IS}=0,006$  ( $p<0,743$ ) demonstrou uma insignificante taxa de endogamia (Tabela 4). A análise de dados utilizando o STRUCTURE sem informação prévia determinou  $K=19$  ( $\Delta K=140.327$ ), indicando a maior probabilidade de grupos genéticos existentes, com valores de máxima verossimilhança igual a  $(\ln P(D)) = -7344.06$  (Fig. 2A). De acordo com o teste de Mantel, existe uma baixa correlação positiva entre as distâncias genéticas e geográficas entre todas as populações analisadas ( $r=0,3619$ ,  $p<0,0020$ ).

A Análise da Variância Molecular (AMOVA) a partir dos *loci* ISSR revelou que 69% da variação genética ocorre dentro das populações, enquanto 31% ocorre entre as populações. O índice de estruturação genética revelou um alto índice de isolamento genético nas populações  $\phi_{ST} = 0,304$  ( $p<0,01$ ) (Tabela 4). A análise de dados utilizando o STRUCTURE

evidenciou um  $K=4$  ( $\Delta K=26.060$ ) com valores de máxima verossimilhança igual a ( $\ln P(D) = -15345.15$ ) (Fig. 2B). De acordo com o teste de Mantel, existe uma correlação positiva e significativa entre as distâncias genéticas e geográficas ( $r=0,568$ ,  $p<0,001$ ) das populações analisadas. A Análise de Coordenadas Principais (PCA) realizada com SSR e ISSR evidenciou uma formação panmítica, confirmado por meio da elipse com significância ( $p<0,05$ ). Para os microssatélites (Fig. 3A), os dois primeiros componentes explicaram apenas 39,69% da variação, enquanto que para os ISSR os dois primeiros componentes explicam 79,47 % da variação (Fig. 3B).

As análises confirmaram dois agrupamentos principais, o primeiro denominamos de Central e contém as populações (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12), o segundo grupo denominado de Norte é composto pelas populações (15, 16 e 17), as quais formam um agrupamento comum para ambos marcadores, que se repete na Análise de Coordenadas Principais (PCA) e nos dendrogramas UPGMA gerados (Fig. 4). No entanto, com maiores valores de bootstrap observados para os *loci* ISSR (Fig. 4B).

Com base nos principais grupos de estruturação genética revelados, a AMOVA demonstrou que a maior variação molecular se encontra dentro dos agrupamentos, sendo maior para o Central (87%), com estrutura genética moderada para ambos. As análises de correlação entre distância genética e geográfica não foram significativas (Tabela 5).

**Tabela 4** Análises referentes à estrutura populacional e divergência genética em 22 populações de *Syagrus coronata* baseadas em 10 *primers* SSR e 10 *primers* ISSR

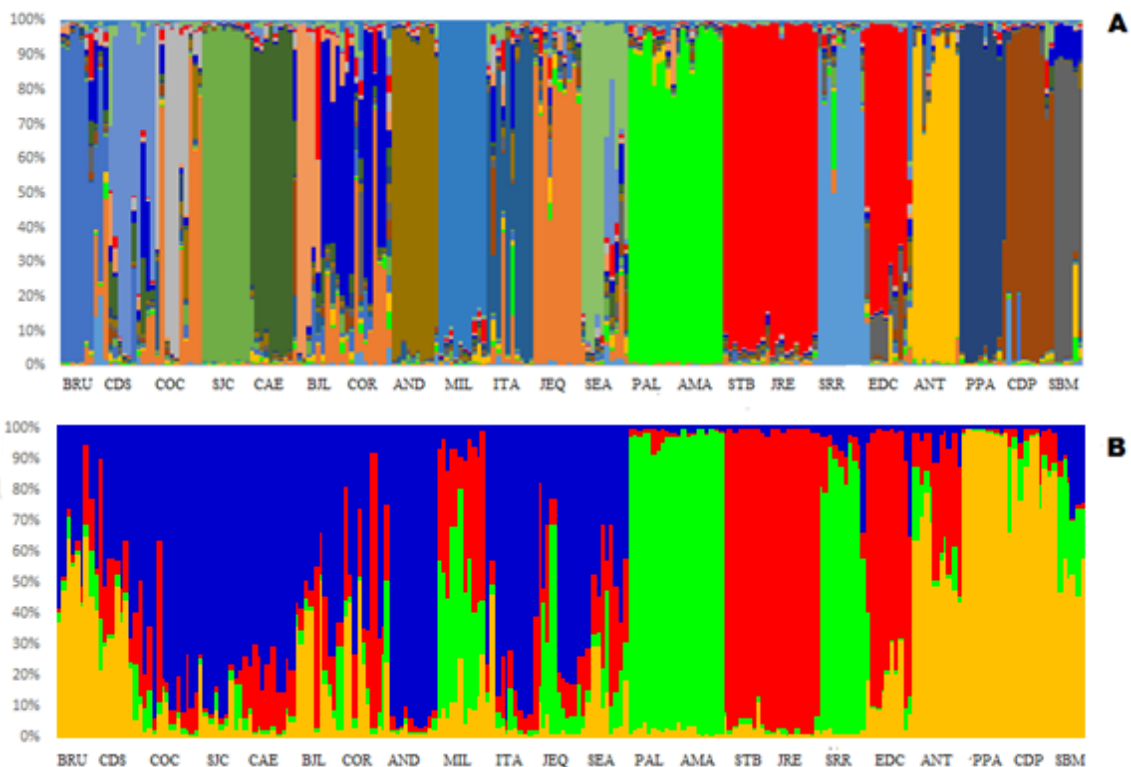
Marcadores	AMOVA (%)	$\phi_{ST}$	<i>p</i> -valor	$F_{IS}$	<i>p</i> -valor
<b>SSR</b>					
Entre populações	9	0,140	$p<0,01$	-0,006	$p>0,743$
Dentro de populações	91				
Total	100				
<b>ISSR</b>					
Entre populações	31	0,304	$p<0,01$		
Dentro de populações	69				
Total	100				

AMOVA (Análise da Variância Molecular),  $\phi_{ST}$  (Índice de Fixação Genética),  $F_{IS}$  (Coeficiente de Endogamia)

**Tabela 5** Análises referentes à estrutura populacional e divergência genética dos agrupamentos revelados por meio da análise bayesiana

SSR		AMOVA (%)	$\phi_{ST}$	p-valor	R <sup>2</sup>	p-valor
<b>Centro</b>	Entre populações	13	0,129	p<0,01	0,6532	p=0,300
	Dentro de Populações	87				
	<b>Total</b>	100				
<b>Norte</b>	Entre populações	23				
	Dentro de populações	77	0,225	p<0,01	0,0032	p=0,360
	<b>Total</b>	100				

AMOVA (Análise da Variância Molecular),  $\phi_{ST}$  (Índice de Fixação Genética), R<sup>2</sup> (Teste de Mantel)



**Fig. 2** Relação genética entre 22 populações naturais de *Syagrus coronata* (216 indivíduos) estimada por *Structure* com base em marcadores SSR (A) e ISSR (B). As linhas verticais indicam os espécimes e as cores representam as frequências alélicas

Análise da Variância Molecular (AMOVA) a partir dos *loci* ISSR revelou que 69% da variação genética ocorre dentro das populações, enquanto 31% ocorre entre as populações. O índice de estruturação genética revelou um alto índice de isolamento genético nas populações  $\phi_{ST} = 0,304$  ( $p < 0,01$ ) (Tabela 4). A análise de dados utilizando o STRUCTURE evidenciou

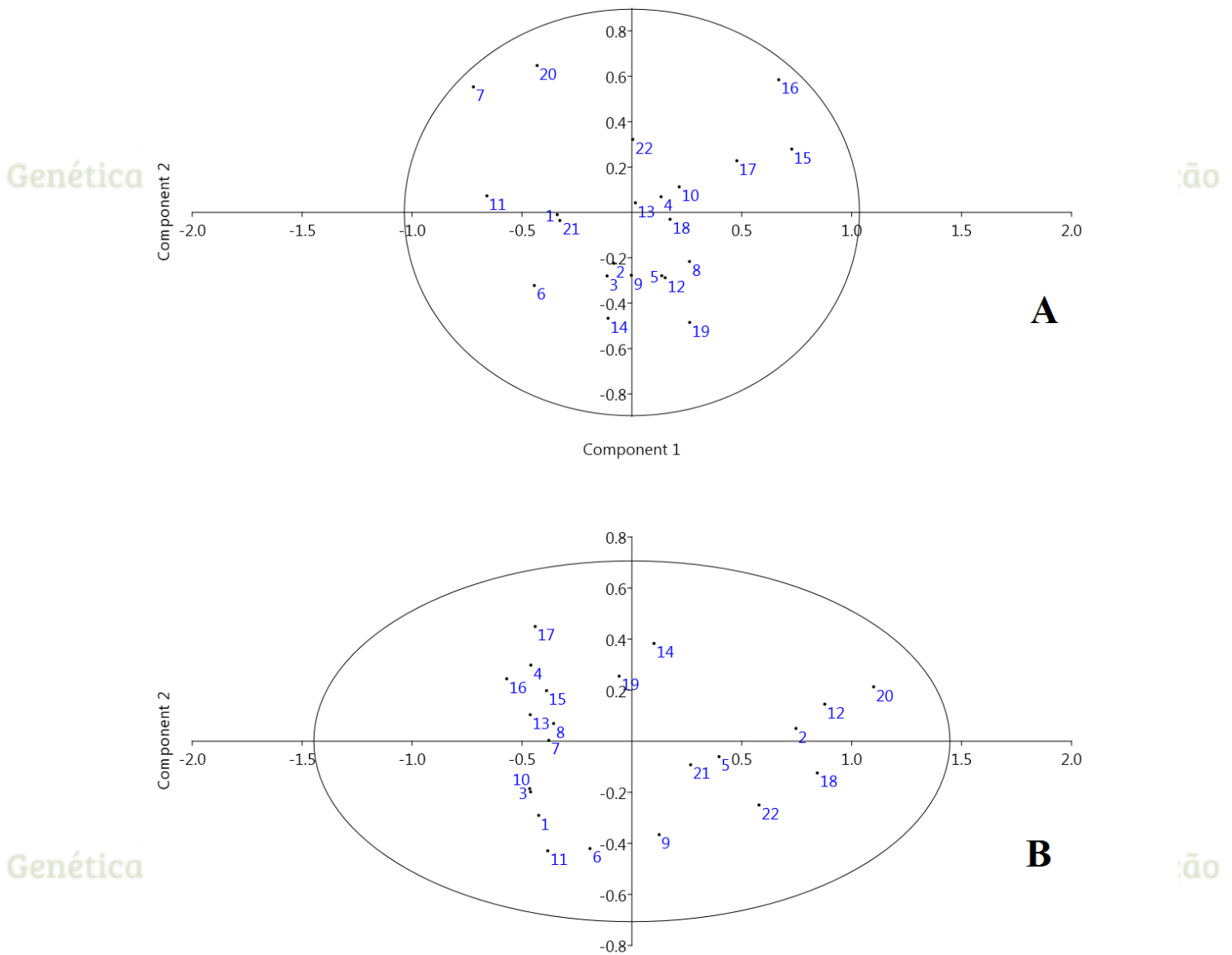


um  $K=4$  ( $\Delta K=26.060$ ) com valores de máxima verossimilhança igual a  $(\ln P(D) = -15345.15)$  (Fig. 2B). De acordo com o teste de Mantel, existe uma correlação positiva e significativa entre as distâncias genéticas e geográficas ( $r=0,568$ ,  $p<0,001$ ) das populações analisadas. A Análise de Coordenadas Principais (PCA) realizada com SSR e ISSR evidenciou uma formação panmítica, confirmado por meio da elipse com significância ( $p<0,05$ ). Para os Microssatélites (Fig. 3A), os dois primeiros componentes explicaram apenas 39,69% da variação, enquanto que para os ISSR os dois primeiros componentes explicam 79,47 % da variação (Fig. 3B). As populações do norte da Bahia (15, 16 e 17) formam um agrupamento comum para ambos marcadores, que se repete na Análise de Coordenadas Principais (PCA) e nos dendrogramas UPGMA gerados (Fig. 4). No entanto, com maiores valores de bootstrap observados para os *loci* ISSR (Fig. 4B).

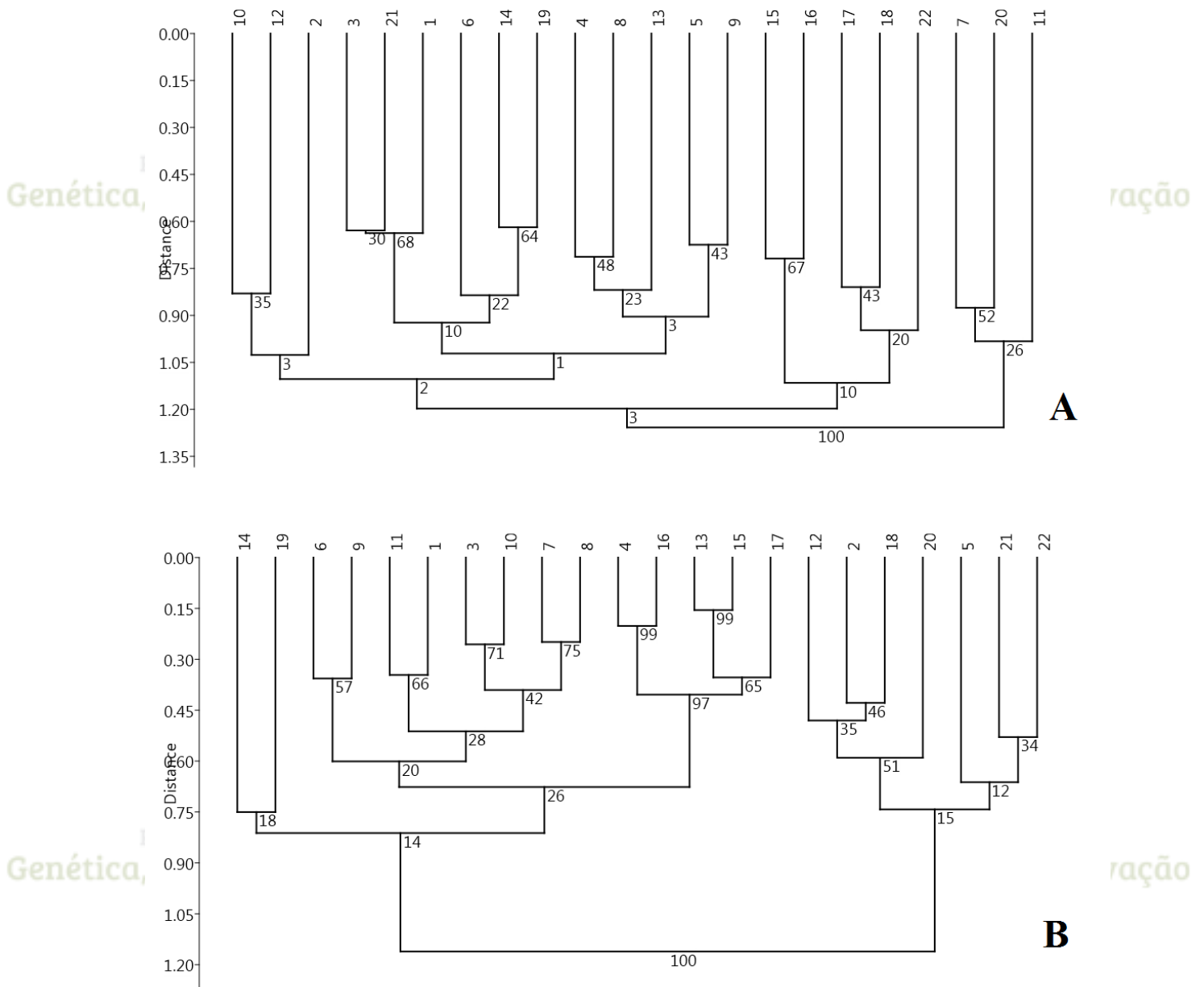
### Modelos de adequação e estabilidade climática

A Modelagem Climática Histórica demonstrou que durante o Último Interglacial (LIG), uma curta faixa de áreas de adequabilidade ao extremo norte da distribuição são observadas comparativamente ao cenário atual de ocorrência de *S. coronata* (Fig. 5D). Durante o Último Máximo Glacial (LGM), uma crescente faixa de estabilidade se soma às regiões mais centrais da distribuição (Fig. 5C). Por outro lado, uma maior faixa de adequação foi observada durante o Médio Holoceno (Mid-H), principalmente para as áreas centrais e oeste da distribuição (Fig 5B).

Os mapas consenso dos modelos climáticos indicaram maior estabilidade climática para o centro e norte da distribuição (Fig. 5). Com áreas de refúgio demonstradas para a região norte da distribuição (Fig. 5 E). Durante o Mid-H, áreas de adequabilidade foram drasticamente reduzidas ao leste do estado de Pernambuco (Fig. 5B). Identificamos zonas comuns de estabilidade em uma faixa contínua que abrange o sudoeste da Bahia ao oeste do estado da Pernambuco. A maioria das populações coletadas nesse estudo está localizada na área com maior adequabilidade, caracterizada por um alto grau de estabilidade histórica, enquanto que o grupo ocidental está localizado dentro de uma área de menor estabilidade (Fig. 5A). As análises a fim de verificar a existência de gargalo ou expansão populacional não foram significativas.



**Fig. 3** Análise das Coordenadas Principais (PCA) em populações de *Syngnus coronata* baseada em *loci* SSR (A) e ISSR (B)



**Fig. 4** Dendrograma UPGMA gerado através de 22 populações de *Syngnus coronata* a partir de *loci* SSR baseados nas distâncias genéticas de Nei (1978) (A) e ISSR baseado nos índices de diferenciação genética entre populações  $F_{ST}$  (B)

## DISCUSSÃO

### Diversidade genética das populações

A distribuição da diversidade genética das populações pode estar relacionada às características ambientais como área de ocorrência, conectividade e heterogeneidade ambiental (Kahilainen et al. 2014). Podemos visualizar por meio dos *loci* SSR, que os valores de diversidade genética são próximos entre as populações de *S. coronata*, no entanto as diferenças observadas se encontram distribuídos de forma heterogênea (Tabela 3). Considerando a ampla distribuição da espécie e diversidade de morfodominios da Caatinga, essa distribuição desigual na composição genética das populações pode refletir a conectividade entre as mesmas, moldando processos de dispersão e polinização entre elas (Rauch & Bar-Yan, 2004; Rocha, 2009). Os desvios no EHW para as populações mais centrais da Bahia (2, 7 e 8), principal região de dispersão atual da espécie (Lorenzi et al. 2004) alertam sobre possíveis processos de seleção, como principalmente o surgimento de novas mutações e migração através da dispersão zoocórica nessas populações (Mayo, 2008). Principalmente para a população 2 (CDS) situada na mesorregião Centro-Sul, local de importante representatividade para biodiversidade da Caatinga. Essa população está próxima a unidade de conservação Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA) (IBAMA, 2006), mas fora da área de proteção legal, sendo atingida principalmente pela agropecuária.

Devido à distinção entre os marcadores quanto ao tipo de herança e amplitude de distribuição no genoma que resultam em diferenças nos níveis de diversidade genética e *loci* polimórficos observados, os microssatélites são mais robustos para a investigação da diversidade genética (Elmeer et al. 2011; Nkongolo et al. 2014; Sabir et al. 2014). A média de diversidade genética ( $H_e=0,716$ ) encontrada com análise dos microssatélites é considerada alta quando comparada a estudos recentes com outras espécies de palmeiras (Arecaceae) analisadas (Tabela 3). Assim, ressaltando que a *S. coronata* está distribuída no semiárido, as hipóteses para explicar os altos níveis de diversidade genética encontrados, favoráveis para a conservação das populações naturais, são possivelmente: a sua floração contínua, que em períodos de estiagem, onde os recursos polínicos são escassos para polinizadores, a *S. coronata* se apresenta como um das poucas espécies disponíveis, e sua capacidade de dispersão de pólen em longas distâncias, por meio das aves, e sobretudo através do vento (Rocha, 2009).



Como exemplo, Ohtani et al. (2009) avaliaram por meio de 12 *loci* microssatélites a diversidade genética em indivíduos de *Livistona chinensis* (Jacq.) var. *boninensis* Becc., espécie dominante em habitats áridos da ilha Bonnins e encontram uma média de  $He=0,661$ . A *Pseudophoenix sargentii* H. Wendl. ex Sarg. uma espécie criticamente ameaçada que possui populações distribuídas nas Bahamas e Florida foi analisada com 10 marcadores SSR revelando uma diversidade genética média de  $He=0,583$  (Namoff et al. 2010). Kaneko et al. (2011) analisaram por meio de nove microssatélites, populações reduzidas de *Livistona rígida* Becc. distribuídas na Austrália, e observaram uma média de diversidade genética de  $He=0,220$ . Populações de *Mauritia flexuosa* L. em savanas e pântanos foram analisadas utilizando-se 13 *loci* microssatélites e apresentaram uma média de diversidade genética de  $He=0,569$  (Federman et al. 2014). Populações da espécie vulnerável *Butia eriospatha* (Mart. ex Drude) Becc foram analisadas por Nazareno & Reis (2014), por meio de nove *loci* microssatélites, revelando uma média de  $He=0,494$ .

Os marcadores dominantes apresentam valores médios até três vezes menores de diversidade genética dentro das populações, comparativamente aos microssatélites, impedindo comparações diretas entre marcadores (Nybom, 2004). Isso foi observado nesse estudo em que os valores médios obtidos para *Syagrus coronata* por meio de *loci* ISSR ( $He=0,197$ ), foram menores em relação a outras espécies de palmeiras, quando analisadas com o mesmo tipo de marcador. Esse fato ocorre, provavelmente, devido à generalização de regiões amplificadas por meio dos *loci* ISSR selecionados (Archibald et al. 2006). Por exemplo, Santos et al. (2015) analisaram 126 amostras de *Attalea vitrivir* Zona por meio de nove *primers* ISSR e encontram uma média de  $He=0,295$ . Vieira et al. (2015) caracterizaram geneticamente populações de *Copernicia prunifera* (Miller) H.E. Moore) através de 12 *primers* ISSR, observando uma média de  $He=0,280$ . Sabir et al. (2014) avaliaram populações de *Phoenix dactylifera* L. com 13 *primers* ISSR e encontram uma média de diversidade igual a  $He=0,480$ .

Uma porcentagem média mais baixa de *loci* polimórficos  $PLP=51,68\%$  foi obtida comparativamente a outras espécies de palmeiras de ambientes áridos analisadas com o marcador ISSR. Por exemplo, as populações de *Attalea vitrivir* (Arecaceae) apresentam  $PLP=93\%$  (Santos et al. 2015). Embora diversos estudos atuais com palmeiras de ampla distribuição em ambientes xéricos tem reportado valores médios de  $PLP$  mais altos para as populações, esses trabalhos utilizaram amostragens baixas (Manimekalai & Nagarajan 2007;

Vieira et al. 2015) e cultivares (Adawy et al. 2005; Hussein et al. 2005; Haider et al. 2012), o que pode enviesar a análise.

Nesse contexto, os microssatélites apresentam maior robustez em refletir a diversidade genética das espécies, pois apresentam uma alta taxa de mutação ( $10^{-3}$ ), resultando em alto polimorfismo (Elmeér et al. 2011; Nkongolo et al. 2014; Xiao et al. 2014). Dentre os resultados obtidos, eles indicaram uma maior diversidade alélica (Tabela 3), como o excesso de heterozigotos para diversas populações, especialmente para a região norte da distribuição como JRE (16) e STB (15) (Xiao et al. 2014). Acreditamos que o excesso de heterozigotos possa ser explicado tanto pela coleta aleatória de indivíduos heterozigotos, onde ao determinarmos a distância mínima de 10 m entre cada indivíduo coletado, evitamos a amostragem de palmeiras estritamente relacionadas devido a germinação de sementes próxima a planta-mãe (Rocha, 2009). Como também, podemos creditar o excesso de heterozigotos à efeitos de sobredominância, onde a condição heterozigota para determinado fenótipo em *Syagrus coronata* apresenta vantagens adaptativas sobre os homozigotos (Gregorius & Ziehe, 1986).

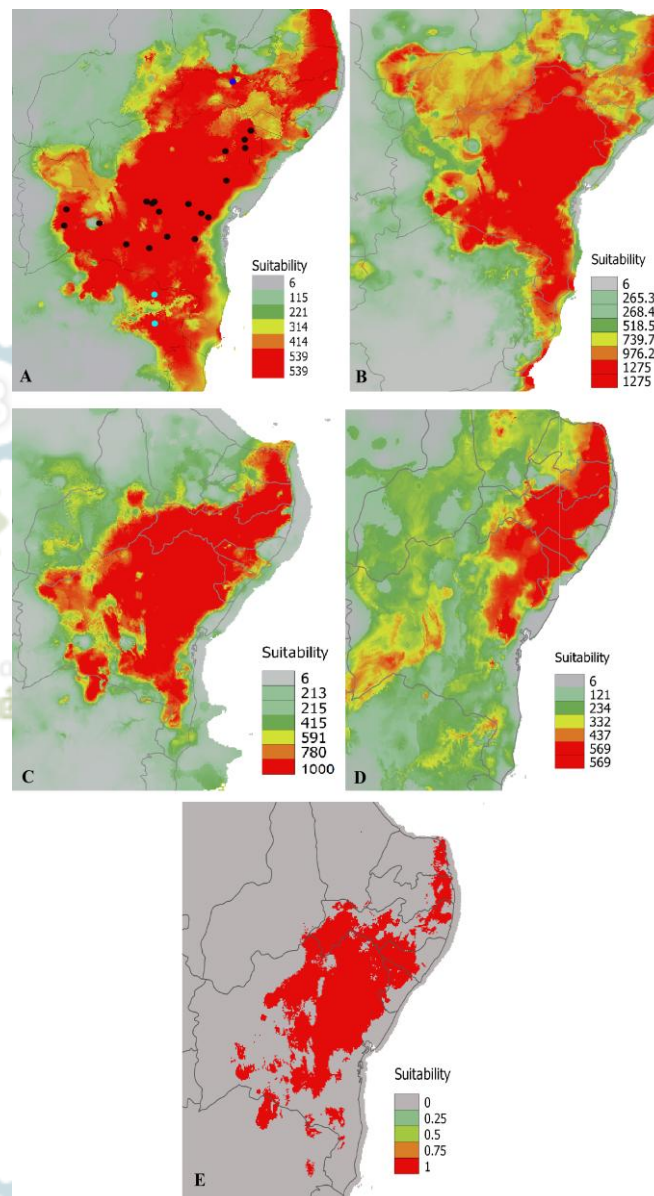
Assim, considerando a resposta a longo prazo das populações naturais às variáveis ambientais diretamente ligadas à preservação da diversidade genética. Os níveis de diversidade genética encontrados para as populações de *S. coronata* não refletem a exploração extrativista, resultado importantes para conservação da espécie, diante a intensa degradação ambiental (Kirk & Freeland 2010).

### **Fluxo Gênico e Estrutura Genética**

Ambos marcadores descreveram isolamento genético nas populações naturais de *Syagrus coronata* (Tabela 4). Diversos fatores tanto naturais quanto gerados por ações humanas podem conduzir à estruturação genética das populações de uma espécie como em um determinado cenário histórico ou a fragmentação do habitat devido ao uso da terra. Fato esse que pode interferir em processos ecológicos importantes como dispersão de frutos e polinização, moldando assim a distribuição da variação genética nas populações (Ge et al. 2005; Karasawa et al. 2009).

Nesse estudo verificamos que a maior variação genética ainda ocorre dentro das populações de *S. coronata* (Tabela 4), assim como dentro dos agrupamentos revelados (Tabela 5), resultado esperado para espécies alógamas que, geralmente, possuem baixos

níveis de autofecundação (Caetano et al. 2008). Observamos padrões similares de compartilhamento de alelos entre as localidades, evidentes graficamente para ambos marcadores. No entanto, os ISSR demonstraram mais claramente as relações entre as populações. A maior taxa de fluxo gênico ocorre na principal região de dispersão atual da espécie, a Central representada por 12 localidades (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12), por outro lado o compartilhamento alélico é mais restrito entre populações da região Norte da distribuição (15, 16, 17 e 18) (Fig. 2 B).



**Fig. 5** Modelagem climática histórica da potencial distribuição da palmeira *Syagrus coronata* em diferentes períodos. Projeção Atual (A), sobreposição dos três modelos (CCSM4, MPI-ESM-P e MIROC-ESM) para Médio Holoceno (Mid-H) (B), Último Máximo Glacial (LGM)



(C), e Último Interglacial (LIG) (D). Em (E) a potencial área de refúgio para a *Syagrus coronata*. As legendas indicam a adequabilidade climática para a ocorrência da espécie.

O maior fluxo gênico entre as populações na região Central do estado da Bahia resultam em uma alta variação genética intrapopulacional para *S. coronata* (Fig. 2 B), que pode ser determinante para a manutenção da espécie em cenários futuros. Contendo os valores mais elevados de diversidade genética para as localidades amostradas, sendo elas (1, 4 e 10) (Tabela 3). Frequentemente populações centrais são maiores em número de indivíduos e menos isoladas geograficamente, resultando em menor diferenciação genética. Ao contrário, populações mais periféricas tendem a ser mais diferenciadas geneticamente, devido principalmente, à distância espacial (Wagner et al. 2011). Contudo, o dendrograma UPGMA gerado para os *loci* ISSR (Fig. 4) demonstrou que as populações 20 e 21 nos limites da distribuição no estado de Minas Gerais estão agrupadas com populações mais distantes, como as localizadas no oeste da Bahia e estado do Pernambuco (Fig. 4, B). O maior nível de variância molecular dentro das populações pode estar sendo mantido, principalmente, por processos de polinização zoófila. Cerca de 87% da variação molecular ocorre dentro dessa região Central com uma moderada diferenciação genética, onde não resistência a polinização e dispersão devido às distâncias geográficas (Tabela 5).

É possível observar, na literatura e em campo, a abundância de polinizadores nas inflorescências do licuri, principalmente, a abelha sem-ferrão *Trigona spinipes*, que apresenta distância curta de voo de forrageamento (50-100 m) (Rocha, 2009). Estudos já descrevem como o sucesso reprodutivo das plantas está mais fortemente associado à frequência de interação inseto-planta e não de efeito por visita (Maldonado et al. 2013). Ressaltamos que a abundância de polinizadores pode ser um fator chave para a manutenção das populações de *S. coronata*, e por isso, é importante a manutenção dos habitats que essas espécies polinizadoras nidificam, como na região Norte onde estão as populações mais isoladas.

O compartilhamento alélico entre as populações da região Norte (Fig. 2) não é apenas importante para a espécie em questão, mas para a manutenção de espécies dependentes do licuri, a exemplo da dispersora *Anodorhynchus leari* (arara-azul-de-lear). As populações de licuri estão situadas entre as 37 áreas de alimentação da *A. leari*, a qual se encontra criticamente ameaçada de extinção. As localidades municípios de Jeremoabo (16) e Euclides da Cunha (18) amostrados nesse estudo ocupam a segunda e terceira posição entre os maiores sítios de alimentação da arara (34,2% e 15,8%, respectivamente). Ressalta-se que apenas



5,4% dessas áreas de alimentação da *A. leari* estão em áreas protegidas (Santos Neto & Camandaroba, 2008). O fluxo gênico entre essas populações é fundamental para manutenção das populações naturais, impedindo a estruturação e redução da diversidade genética para ambas espécies (licuri e arara-azul). Apesar de ambos marcadores revelarem menor fluxo gênico da região Norte com a Central, devido provavelmente a distribuição espacial, os resultados evidenciam excesso de heterozigotos, e maior variação molecular dentro das populações sem resistências internas ao fluxo gênico quanto a distância espacial (Tabela 5). Esse dado sugere, que processos como depressão endogâmica, que poderia conduzir a uma extinção local não ocorre até o momento. Tais diagnósticos sobre o fluxo gênico e diversidade genética, aumentam a capacidade de prever as respostas das populações naturais às variáveis ambientais, e adaptabilidade evolutiva das espécies (Hughes et al. 2008).

Logo, sendo a maior variância molecular encontrada dentro das populações, os níveis significativos de estruturação genética demonstram um padrão histórico da espécie, não refletindo a atual fragmentação de habitat. No entanto, considerando o cenário de aumento da fragmentação da paisagem associado, principalmente, ao desenvolvimento urbano e à agropecuária, os resultados encontrados para a *S. coronata* são base para comparações futuras (Conceição & Oliveira 2010).

#### **Padrões históricos da distribuição de *Syagrus coronata***

A modelagem climática histórica indica uma expansão contínua de áreas com condições adequadas para a dispersão da palmeira *S. coronata* desde o Último Período Interglacial (LIG). Ao final desse período, regiões com alta adequabilidade se encontravam em uma curta faixa estendida do Rio Grande do Norte ao extremo norte da Bahia (Fig. 5D). A modelagem climática para esse período pode explicar o nível de estruturação genética encontrada na região norte evidenciada por ambos marcadores, devido, provavelmente, à um fluxo gênico restrito entre as populações nessa área durante o LIG (Fig. 2). Esses resultados também indicam que essa curta faixa que abrange principalmente o norte da distribuição é a possível região de origem de dispersão da espécie, como demonstrado através das áreas de refúgio para *S. coronata* (Fig. 5 E). Atualmente, o centro de dispersão está localizado no estado da Bahia, onde se encontra a maior abundância de populações de *S. coronata* como visualizado através da amostragem desse estudo (Fig. 1).

O Último Período Interglacial (LIG) é caracterizado pelo retrocedimento do gelo, devido ao aumento da temperatura da terra consequente de mudanças na sua órbita (Werneck

et al. 2011). Estudos recentes revelam que tais alterações bruscas permitiram o avanço das florestas e moldaram traços funcionais importantes para dispersão das palmeiras nas Américas. O tamanho do fruto, por exemplo, apresentou correlações positivas com o aumento da sazonalidade nessa época (Gödel et al. 2015). Entendemos que no contexto de *S. coronata*, durante esse período instável, a contínua frutificação e longevidade característica dessa espécie (Rocha, 2009), pode ter sido algumas das vantagens evolutivas que permitiram a manutenção dos processos de polinização e dispersão, e conseqüentemente o fluxo gênico entre as populações locais. Considerando a alta e amplamente distribuída diversidade genética encontrada para a localidades analisadas (Tabela 3; Figura 3)

Ao longo do Último Máximo Glacial (LGM), áreas com alta adequabilidade climática foram estendidas até a região sul da Bahia. Durante esse período, tais regiões apresentavam pouca precipitação e baixa evapotranspiração. Assim, condições climáticas mais secas são descritas e propiciaram a redução das florestas úmidas (Clapperton, 1993), permitindo a expansão das Florestas Tropicais Sazonalmente Secas (SDTFs), incluindo o grande núcleo da Caatinga (Werneck et al. 2011). Nesse período, as principais áreas de adequabilidade climática para *S. coronata* se encontravam nessas áreas mais secas e abertas, especificamente ao leste da Paraíba, em grande parte do estado de Pernambuco e da região norte ao sudoeste do estado da Bahia. Estudos relacionados a espécies de regiões mais áridas relatam respostas variáveis às oscilações climáticas do Pleistoceno tardio, sendo uma delas a expansão de suas populações, como visualizado aqui para a *S. coronata* (Fig. 5 C), contrário à resposta de outras espécies associadas à florestas úmidas (Kirk & Freeland 2010; Turchetto-Zolet et al. 2012).

Diferentemente do Último Máximo Glacial (LGM), o Médio Holoceno (Mid-H) é caracterizado por um período climaticamente mais estável (Lamy et al. 2001). Esse período é tipicamente caracterizado por ter maiores índices de precipitação (Werneck et al. 2011). Durante o Mid-H as regiões norte e sul da distribuição foram tomadas por áreas com alta adequabilidade para a ocorrência da *S. coronata* (Fig. 5 B). Nesse período, áreas de adequação climática na região oeste do estado da Bahia já eram consistentes, influenciando possivelmente na capacidade de dispersão da espécie para essa região, como a atual população de Cocos-BA (Fig. 5A), situada fora da área de dispersão originalmente descrita (Lorenzi et al. 2004).

Em geral, a modelagem climática histórica demonstrou um aumento acentuado de áreas com potencial de ocorrência de *S. coronata* do LIG até os dias atuais. Observamos que o contínuo de áreas estáveis, que abrange principalmente o norte da distribuição (Fig. 5 D), apresentou uma crescente adequabilidade climática, concomitantemente ao centro da distribuição e se tornou mais estável, incluindo todas as localidades amostradas nesse estudo. Além disso, estudos recentes com palmeiras relacionam populações com maior diversidade genética a áreas com uma histórica estabilidade climática (Carvalho et al. 2017). Essas áreas podem ter atuado como refúgios para a espécie durante os períodos glaciais (Fig. 5 E), e se sobrepõem as áreas de refúgios encontradas para Florestas Tropicais Sazonalmente Secas (SDTFs) no grande núcleo da caatinga no nordeste do Brasil (Werneck et al. 2011). Estas florestas são caracterizadas por baixa precipitação e longos períodos de estiagem, condições favoráveis para o licuri, palmeira característica do semiárido (Lorenzi et al. 2004).

Com base na suposição de que a estabilidade de grandes populações e alta diversidade genética intraespecífica estão associadas a áreas historicamente estáveis durante as mudanças climáticas (Werneck et al. 2011). Na ampla distribuição atual da *S. coronata*, alcançando regiões de transição entre os biomas Caatinga e Cerrado, como também nos altos valores de diversidade genética amplamente distribuídos encontrados, ao logo das localidades analisadas (Tabela 3). Concluímos que o padrão de diversidade genética visualizado para *S. coronata* é resultado de uma estabilidade e dispersão histórica do Último Período Interglacial (LIG) ao presente.

### **Implicações para a conservação**

Embora a América do Sul abrigue a maior biodiversidade do mundo, distribuída em diversas regiões biogeográficas (Turchetto-Zolet et al. 2012), a maneira como as alterações climáticas durante o Pleistoceno tardio influenciaram a dispersão das espécies na subaméricas não são totalmente entendidas, principalmente para ambientes xéricos (Caetano et al. 2008). Deve-se salientar que a maioria dos estudos realizados com palmeiras se concentram em florestas úmidas e cultivares, e poucos com populações naturais, deixando assim uma lacuna de conhecimento genético sobre essas espécies-chave para ambiente áridos (Hussein et al. 2005; Haider et al. 2012).

Diversas espécies de palmeiras que atualmente se encontram ameaçadas, apresentaram anteriormente uma distribuição geográfica ampla, reduzidas principalmente devido ao desmatamento, fragmentação do habitat e introdução de espécies domésticas em áreas de populações selvagens (Nazareno e Reis, 2014). O acesso à história paleoclimática e

distribuição da diversidade genética disponibilizados nesse estudo são de extrema importância para gerir as populações de *S. coronata* de forma eficiente, pois estas sofrem com reduções populacionais devido, principalmente, à exploração extrativista (Drumond 2007). O extrativismo desenfreado e o total aproveitamento do licuri tem culminado em processos de extinções locais, como as populações do município de Águas Belas no sertão de Pernambuco (Silva et al. 2006).

Compreendemos que os valores de diversidade genética distribuídos ao longo das populações, refletem um padrão histórico de estabilidade climática, e ainda não expressam os atuais impactos antrópicos sofridos pela espécie. Verificamos que todas as localidades de *S. coronata* apresentam altos valores de diversidade. Sendo uma base de comparação para outros estudos, como uma espécie que apresenta condições genéticas próximas do ideal para a conservação. Para planos de manejo e conservação, indicamos que as localidades mais representativas geneticamente estão localizadas no centro da Bahia (2, 3 e 10), e podem ser fontes de germoplasma em futuros projetos de conservação nessa região, tanto *in situ* quanto *ex situ*. Somando-se a isso, sugerimos que as populações situadas no norte da Bahia (15, 16, 17 e 18) devam ser consideradas como Unidades Evolutivamente Significativas (UES) (Frankham, 2008), considerando a maior diferenciação genética destas populações, demonstrada repetidamente por meio das análises realizadas. Sendo a população (16) indicada como localidade fonte para conservação de germoplasma dessa região por apresentar o maior índice de heterozigotos ( $H_o = 0,990$ ) (Tabela 3).

Ressaltamos ainda a importância das populações nos extremos da distribuição, essas populações estão em contato com outros biomas e condições ambientais distintas como as populações (3, 6 e 7) à oeste da distribuição (Figura 1), que estão localizadas em áreas de transição entre Caatinga e Cerrado, elas apresentam características genéticas adaptativas únicas. Assim, para a conservação de espécies com ampla distribuição, o nível de diversidade genética não é o único quesito a ser considerado em um programa de conservação, mas também a maior representatividade genética populacional (Caetano et al. 2008).

**Agradecimentos** Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB) pela concessão da bolsa. À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) por facilitar a pesquisa. Ao Herbário da UESB (HUESB) por auxiliar com a coleção amostrada. Ao grupo de pesquisa Biologia, Genética e Melhoramento Vegetal por assistir em todas as fases desse trabalho.



## Referências

Adawy SS, Hussein EHA, Ismail SEME, El-Itriby HA (2005) Genomic diversity in date palm (*Phoenix dactylifera L.*) as revealed by AFLPs in comparison to RAPDs and ISSRs. Arab J Biotech 8:99-114

Araújo MRG, Júnior AFM, Menezes EV, Brandão MM, Cota LG, Oliveira DA (2017) Fine-scale spatial genetic structure and gene flow in *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): Analysis in an overlapping generation. Biochemical Systematics and Ecology 71:147-154. doi: doi.org/10.1016/j.bse.2017.02.005

Arruda SR, Pereira DG, Silva-Castro MM, Brito MG, Waldschmidt AM (2017) An optimized protocol for DNA extraction in plants with a high content of secondary metabolites, based on leaves of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Leguminosae). Genet Mol Res 3: gmr16039063 doi: http://dx.doi.org/10.4238/gmr16039063

Bondar G. O licurizeiro *Cocos coronata* Mart. e suas pontecialidades. Salvador, Bahia

Caetano S, Prado D, Pennington RT, Beck S, Oliveira-Filho A, Spichiger R, Naciri Y (2008) The history of Seasonally Dry Tropical Forests in eastern South America: inferences from the genetic structure of the tree *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). Mol Ecol 17:3147–3159. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03817.x

Campos PRA, Rosas A, Oliveira VM, Gomes MAF (2013) Effect of Landscape Structure on Species Diversity. PLoS ONE 8:66495. doi:10.1371/Journal.pone.0066495

Carvalho CS, Ballesteros-Mejia L, Ribeiro MC, Côrtes MC, Santos AC, Collevatti1 RG (2017) Climatic stability and contemporary human impacts affect the genetic diversity and conservation status of a tropical palm in the Atlantic Forest of Brazil. Conserv Genet 18:467-478. doi: 10.1007/s10592-016-0921-7

Conceição KS, Oliveira VM (2010) Habitat fragmentation effects on biodiversity patterns. Physica 17: 3496-3502. doi:10.1016/j.physa.2010.04.036.x

Costa R, Pereira G, Garrido I, Tavares-de-Sousa MM, Espinosa F (2016) Comparison of RAPD,ISSR, and AFLP Molecular Markers to Reveal and Classify Orchardgrass (*Dactylis*

*glomerata* L.) Germplasm Variations. PLoS ONE 11: e0152972. doi:10.1371/journal.pone.0152972

Drumond MA (2007) Licuri *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. EMBRAPA Semiárido. [http://www.cpatsa.embrapa.br/public\\_eletronica/downloads/SDC199.pdf](http://www.cpatsa.embrapa.br/public_eletronica/downloads/SDC199.pdf). Acessado em 14 de Junho de 2017.

Eiserhardt W, Svenning JC, Kissling WD, Balslev H (2011) Geographical ecology of the palms (Arecaceae): determinants of diversity and distributions across spatial scale. *Annals of Botany* 1:1-26. doi:10.1093/aob/mcr146

Elmeer K, Sarwath H, Malek J, Baum M, Hamvieh A (2011) New microsatellite markers for assessment of genetic diversity in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Biotech* 1: 91-97. doi:10.1007/s13205-011-0010-z

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14: 479-491. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x

Falush D, Stephens M, Prichard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol Ecol Notes* 7:574-578. doi:10.1111/j.1471-82862007.01758.x

Federman S, Hyseni C, Clement W, Oatham MP, Caccone A (2014) Habitat fragmentation and the genetic structure of the Amazonian palm *Mauritia flexuosa* L.f. (Arecaceae) on the island of Trinidad. *Conserv Genet* 15:355–362. doi:10.1007/s10592-013-0543-2.x

Ge XJ, Zhang LB, Yuan YM, Hao G, Chiang TY (2005) Strong genetic differentiation of the East-Himalayan *Megacodon stylophorus* (Gentianaceae) detected by Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR). *Biodivers Conserv* 14: 849–861. doi:10.1007/s10531-004-0655-6.x

Gödel B, Kissling WD, Svenning JC (2015) Geographical variation and environmental correlates of functional trait distributions in palms (Arecaceae) across the New World. *Bot J Linn Soc* 179: 602–617. doi:10.1111/boj.12349

Gomez-Navarro C, Jaramillo C, Herrera F, Wing SL, Callejas R (2009) Palms (Arecaceae) from a Paleocene rainforest of northern Colombia. *Ame J Bot* 96:1300–1312. doi:10.3732/ajb.0800378

Gregorius HR, Ziehet M (1986) The Significance of Over- and Underdominance for the Maintenance of Genetic Polymorphisms II. Overdominance and Instability with Random Mating. *J theor Biol* 118: 115-125

Guisan A, Thuiller W (2005) Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. *Ecol Lett* 8:993-1009. doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00792.x

Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleo Elec* 4: 9

Haider N, Nabulsi I, Mir AN (2012) Phylogenetic relationships among date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars in Syria using RAPD and ISSR markers. *J Plant Bio Res* 1:12-24.

Hughes AR, Inouye BD, Johnson MTJ, Underwood N, Vellend M (2008) Ecological consequences of genetic diversity. *Ecol Lett* 11: 609–623. doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x

Hussein EHA, Adawy SS, Seme I, El-Itriby HA (2005) Molecular characterization of some Egyptian date palm germplasm using RAPD and ISSR markers. *Arab J Biotech* 8:83-98.

IBAMA (2006) Plano de manejo Floresta Nacional Contendas do Sincorá. Ministério do Meio Ambiente – MMA. [http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/imgs-unidades-coservacao/contendas\\_do\\_sincora1.pdf](http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/imgs-unidades-coservacao/contendas_do_sincora1.pdf). Acessado em 09 de Outubro de 2017

Jensen JL, Bohonak AJ, Kelley ST (2005) Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6:13. doi:10.1186/1471-2156-6-13

Lamy F, Hebbeln D, Röhl U, Wefer G (2001) Holocene rainfall variability in southern Chile: a marine record of latitudinal shifts of the Southern Westerlies. *Earth Planet Sci Lett* 185:369-382. doi:0012-821x

Lorenzi H, Souza HM, Cerqueira LSC, Costa JTM, Ferreira E (2004) *Palmeiras Brasileiras e Exóticas Cultivas*. Nova Odessa, São Paulo

Karasawa MMG (2009) *Diversidade reprodutiva de plantas*. Ribeirão Preto, São Paulo

Kaneko S, Kondo T, Isagi Y (2011) Development of microsatellite markers for the northern Australian endemic fan palm *Livistona rigida* (Arecaceae), with cross-amplification in the five related species. *Conserv Genet* 3:697–699. doi:10.1007/s12686-011-9436-1

Khierallah HSM, Al-Sammarraie SKI, Mohammed HI (2014) Molecular characterization of some Iraqi date palm cultivars using RAPD and ISSR markers. *J Asian Sci Res* 9:490-503.

Kirk H, Freeland JR (2011) Applications and Implications of Neutral *versus* Non-neutral Markers in Molecular Ecology. *Int J Mol Sci* 12:3966-3988. doi:10.3390/ijms12063966

Maldonado MB, Lomáscolo SB, Vázquez DP (2013) The Importance of Pollinator Generalization and Abundance for the Reproductive Success of a Generalist Plant. *PLoS ONE* 10: 75482. doi:org/10.1371/journal.pone.0075482.x

Manimekalai R, Nagarajan P (2006) Assessing genetic relationships among coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions using inter simple sequence repeat markers. *Sci Hortic* 108: 49–54. doi:10.1016/j.scienta.2006.01.006

Mayo, O (2008) A Century of Hardy–Weinberg Equilibrium. *Twin Res H Gen* 11: 249–256. doi:10.1375/twin.11.3.249

Miranda EA, Batalha-Filho H, Congrains C, Carvalho AF, Ferreira KM, Del Lama MA (2016) Phylogeography of *Partamona rustica* (Hymenoptera, Apidae), an Endemic Stingless Bee from the Neotropical Dry Forest Diagonal. *PLoS ONE* 11: 10. doi:e0164441. doi:10.1371/journal.pone.0164441

Namoff S, Francisco-Ortega J, Zona S, Lewis C (2010) Microsatellite markers developed for the Caribbean palm *Pseudophoenix sargentii*: two PCR-based methods. *Conserv Genet Resour* 2:85–87. doi:10.1007/s12686-009-9168-7



Nazareno AG, Reis MS (2014) Where did they come from? Genetic diversity and forensic investigation of the threatened palm species *Butia eriospatha*. *Conserv Genet* 15: 441–452. doi:10.1007/s10592-013-0552-1

Nei, M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590 doi:PMC1213855

Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol Ecol* 13: 1143-1155. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02141.x

Nkongolo KK, Gervais S, Michael P, Zhou Y (2014) Comparative analysis of Inter Simple Sequence Repeats and Simple Sequence Repeats markers: genetic analysis of *Deschampsia cespitosa* populations growing in metal contaminated regions in Canada. *Am J Bioc Biot* 10: 69-80. doi:10.3844/ajbbbsp.2014.69.80

Ohtani M, Tani M, Yoshimaru H (2009) Isolation of polymorphic microsatellite loci in *Livistona chinensis* (Jacq.) R.Br. ex Mart. var. *boninensis* Becc., an endemic palm species of the oceanic Bonin Islands, Japan. *Conserv Genet* 10:997–999. doi:10.1007/s10592-008-9671-5

Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Gene Mol Pós Biol* 29:294-307. doi:dx.doi.org/10.1590/S1415-47572006000200018

Oosterhout CV, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x

Peakall R, Smouse PE (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28:2537-2539. doi:10.1093/bioinformática/bts460

Rauch EM, Bar-Yam Y (2004) Theory predicts the uneven distribution of genetic diversity within species. *Nature* 431:449-452. doi:10.1038 / nature02745

Rocha KMR (2009) Biologia Reprodutiva da Palmeira licuri (*Syagrus coronata* (MART.) BECC.) (ARECACEAE) na ecorregião do Raso da Catarina, Bahia. Dissertation, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Sabir JSM, Abo-Aba S, Bafeel S, Zari TA, Edris S, Shokry AM, Atef A et al. (2014) Characterization of ten date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars from Saudi Arabia using AFLP and ISSR markers. C R Biologies 337:6–18. doi:dx.doi.org/10.1016/j.crvi.2013.11.003

Santos NJR, Camandaroba M (2007) Ampliação da área de ocorrência da arara-azul-de-lear *Anodorhynchus leari* (Bonaparte 1856). Ornithologia 2: 63-64.

Santos RRM, Cavallari MM, Pimenta MAS, Abreu AG, Costa MR, Guedes ML (2015) Population genetic structure of *Attalea vitrivir* Zona (Arecaceae) in fragmented areas of southeast Brazil. Genet Mol Res 14: 6472-6481. doi:10.4238/2015.June.11.23

Silva VA, Andrade LHC, Albuquerque UP (2006) Revising the Cultural Significance index: The Case of the Fulni-ô in Northeastern Brazil. Field Met 18:98-108. doi: doi/abs/10.1177/1525822X05278025

Simplicio RR, Pereira DG, Waldschmidt AM (2017) Transferability of microsatellite markers in *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. (Arecaceae), an iconic palm tree from the Brazilian semiarid region. Genet Mol Res 16: gmr16029699. doi:http://dx.doi.org/10.4238/gmr16029699

Thuiller W, Georges D, Engler R, Breiner F, Georges MD, Thuiller CW (2016) Package ‘biomod2’. Acesso em 12 de Junho de 2016: pftp://ftp2.de.freebsd.org/pub/misc/cran/web/packages/biomod2/biomod2.pdf

Turchetto-Zolet AC, Pinheiro F, Salgueiro F, Palma-Silva C (2013) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. Mol Ecol 22:1193-1213. doi:10.1111 / mec.12164

Vieira FA, Sousa RF, Silva RAR, Fajardo CV, Molina WF (2015) Diversidade genética de *Copernicia prunifera* com o uso de marcadores moleculares ISSR. Agrária 10:525-531. doi:10.5039/agraria.v10i4a5040

Wagner V, Durka W, Hensen I (2011) Increased genetic differentiation but no reduced genetic diversity in peripheral vs. central populations of a steppe grass. *Ame J Bot* 98:1173–1179. doi:10.3732/ajb.1000385

Werneck FP (2011) The diversification of eastern South American open vegetation biomes: Historical biogeography and perspectives. *Quat Sci Rev* 30:1630-16-48. doi:doi.org/10.1016/j.quascirev.2011.03.009

Werneck FP, Costa GC, Colli GR, Prado DE, Sites Jr W (2011) Revisiting the historical distribution of Seasonally Dry Tropical Forests: new insights based on palaeodistribution modelling and palynological evidence. *Global Ecol Biogeogr* 20:272-288. doi:10.1111/j.1466-8238.2010.00596.x

Wright S (1978) *Evolution and the Genetics of Populations*. Chicago Press, Chicago

Xiao Y, Zhou L, Xia W, Mason AS, et al. (2014) Exploiting transcriptome data for the development and characterization of gene-based SSR markers related to cold tolerance in oil palm (*Elaeis guineensis*). *BMC Plant Biol* 4: 384-396. doi:10.1186/s128700140384-2

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183. doi:10.1006/geno.1994.1151

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

Os *loci* heterólogos testados são transferíveis e juntamente com os ISSR foram eficientes para o estudo populacional com a palmeira *Syagrus coronata*, suprimindo a inexistência de *loci* espécie-específicos que são custosos e demandam tempo.

A diversidade genética encontrada para a espécie *S. coronata* com os dez *primers* SSR foi considerada alta em comparação a outras espécies de palmeiras igualmente exploradas. Ambos marcadores revelaram importantes relações entre as populações, como as localizadas no norte da Bahia. Apesar da maior diversidade genética está dentro de suas populações, foi detectada estruturação possivelmente devido a efeitos de fragmentação e diminuição de dispersão de pólen e sementes.

A modelagem climática histórica indica uma expansão contínua de áreas com condições adequadas para a dispersão da palmeira *Syagrus coronata*, desde o Último Período Interglacial (LIG). Algumas áreas com alta adequação climática se sobrepõem às áreas de importantes refúgios na caatinga do nordeste do Brasil.

Os dados paleoclimáticos e a distribuição da diversidade genética disponibilizados aqui são de extrema importância para selecionar populações de *Syagrus coronata* como fontes de genótipos para conservação tanto *in situ* quanto *ex situ*, uma vez que estas sofrem com reduções populacionais devido principalmente à exploração extrativista.



## ANEXOS

**Tabela S1** Localidades amostradas e suas respectivas informações geográficas e número amostral

Localidade	Código	Latitude (°N)	Longitude (°W)	Altitude (A)	Amostras (N)
<b>Dados de presença</b>					
<b>Bahia</b>					
Brumado	1	14° 11' 50"	41° 40' 09"	415	10
Contendas do Sincorá	2	13° 45' 44"	41° 02' 33"	292	10
Cocos	3	12° 43' 20"	44° 33' 53"	775	10
Campos de São João	4	13° 51' 04"	40° 04' 52"	218	10
Caetitê	5	14° 03' 17"	42° 28' 28"	829	10
Bom Jesus da Lapa	6	13° 14' 52"	43° 24' 53"	430	10
Correntina	7	13° 20' 25"	44° 38' 35"	575	10
Andaraí	8	13° 03' 24"	39° 37' 35"	405	10
Milagres	9	12° 25' 17"	41° 46' 00"	419	10
Itaberaba	10	11° 09' 00"	42° 03' 00"	272	10
Jequié	11	17° 04' 05"	41° 28' 55"	672	10
Seabra	12	12° 25' 54"	41° 29' 25"	724	10
Palmeiras	13	12° 48' 26"	41° 19' 36"	697	10
Amargosa	14	15° 57' 50"	41° 29' 41"	701	10
Santa Brígida	15	12° 52' 14"	39° 51' 04"	317	10
Jeremoabo	16	07° 59' 54"	38° 37' 07"	275	10
Serrinha	17	12° 30' 57"	40° 18' 14"	379	10
Euclides da Cunha	18	10° 30' 22"	39° 00' 33"	442	10
Antas	19	10° 24' 00"	38° 20' 00"	510	10
<b>Minas Gerais</b>					
Padre Paraíso	20	16° 17' 17"	42° 91' 49"	672	10
Cachoeira do Pajeú	21	07° 56' 09"	38° 41' 37"	701	10
<b>Pernambuco</b>					
São José do Belmonte-PE	22	07° 51' 37"	38° 45' 35"	479	06
<b>Dados de Ausência</b>					
Vitória da Conquista-BA	-	14° 51' 53"	40° 50' 13"	874	-

Riacho do Santana-BA	-	13° 36' 33''	42° 56' 20''	627	-
Tucano-BA	-	10° 57' 45''	38° 47' 25''	221	-
Salinas-MG	-	16° 08' 36''	48° 18' 13''	513	-
Medina-MG	-	16° 13' 27''	41° 28' 40''	578	-
Januária-MG	-	15° 29' 44''	44° 21' 45''	448	-
Águas Vermelhas-MG	-	15° 44' 51''	14° 27' 39''	729	-
Serra Talhada-PE	-	07° 59' 07''	38° 17' 34''	443	-
Belém de São Francisco-PE	-	08° 45' 31''	38° 57' 45''	302	-
Petrolândia-PE	-	09° 04' 12''	38° 16' 64''	319	-



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação