



**HÉLIDA MARA MAGALHÃES**

**DIVERSIDADE GENÉTICA,  
CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E  
CONTEÚDO DE DNA DE DIFERENTES  
TECIDOS DE *Butia capitata***

**LAVRAS - MG**

**2014**

**HÉLIDA MARA MAGALHÃES**

**DIVERSIDADE GENÉTICA, CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL  
E CONTEÚDO DE DNA DE DIFERENTES TECIDOS DE *Butia*  
*capitata***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de doutor.

Orientador

Dr. Moacir Pasqual

**LAVRAS – MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Magalhães, Héliida Mara.

Diversidade genética, caracterização nutricional e conteúdo de  
DNA de diferentes tecidos de *Butia capitata* / Héliida Mara  
Magalhães. – Lavras : UFLA, 2014.

128 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. Arecaceae. 2. Coquinho-azedo - Diversidade genética. 3.  
Coquinho-azedo - Caracterização nutricional. 4. Citometria de  
Fluxo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.97450415

**HÉLIDA MARA MAGALHÃES**

**DIVERSIDADE GENÉTICA, CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL  
E CONTEÚDO DE DNA DE DIFERENTES TECIDOS DE *Butia  
capitata***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de doutor.

APROVADA em 15 de janeiro de 2014.

Dr. Ângelo Albérico Alvarenga	EPAMIG
Dra. Leila Aparecida Salles Pio	UFLA
Dr. João Bosco dos Santos	UFLA
Dra. Luciane Vilela Resende	UFLA

Dr. Moacir Pasqual  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2014**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me abençoado com muita sabedoria, calma e paciência, por sempre ser luz nos meus caminhos e em toda a minha vida. Agradeço especialmente a minha família, meus pais Geraldino e Hermínia pelo incentivo, e dedicação, e também agradeço aos meus irmãos Dayse, Marcus e Cristiane pelo carinho e apoio.

Ao professor Dr. Moacir Pasqual pela disponibilidade na orientação, amizade e apoio.

Ao professor Dr. Paulo Sérgio da UFMG e sua equipe de trabalho - Grupo de Estudos em Frutíferas Exóticas e Nativas -, especialmente a Diemesson e Herick que muito contribuíram na coleta do material realizado na pesquisa.

Aos agricultores que permitiram a coleta dos frutos em suas áreas, Sr. Jair, Sr. Reginaldo, Senhores Santos e a Jaime da Emater, pelo grande apoio e também ensinamentos.

Ao professor Luiz Carlos do departamento de Ciência de Alimentos, as laboratoristas Tina, Denise e Heloisa, a Tatiane, Marcelo e a Telma pela contribuição com os ensaios de caracterização nutricional.

À professora Luciane, as laboratoristas Elenir e Dona Elza, e Mariney, pelo auxílio ao trabalho de diversidade.

Ao professor Bosco, a Lamartine, aos amigos do laboratório de Genética Molecular Igor, Juliana Veloso, Juliana, Letícia, Danusa, Felipe, Chadreque, Monique, e muito especialmente ao Lucas Rezende pela enorme e valiosa contribuição com os estudos de diversidade.

À professora Denise do laboratório de Anatomia Vegetal da UFMG.

Aos colegas do Grupo de estudo em cultura de tecidos, muito especialmente à Leila pelo grande apoio e incentivo nos trabalhos. Agradeço especialmente à Flávia, minha estagiária, que foi meu braço direito durante toda essa jornada. Agradeço também com muito carinho os laboratoristas

Clarete e Vantuil pela alegria, contribuição e boa vontade nos auxílios com os trabalhos.

Aos amigos Hugo, Wuiara, Sara, Raoni, Fernanda, Thamires, Sílvio, Dora, David, Gabriel e Natalia da Citogenética, Leo Fernandes, Marcela, Maruzanete, Larissa, Amanda Fialho, Elio e Maria Isabel Alencar e Edelzia da UFMG, pelo apoio na realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Lavras, o Departamento de Agricultura e professores do programa de Pós-Graduação em Fitotecnia.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim, a todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização desta pesquisa.

## RESUMO

*Butia capitata* é uma palmeira nativa do cerrado popularmente conhecida por coquinho-azedo, ameaçada de extinção. Seus frutos são amplamente consumidos na região norte de Minas Gerais principalmente *in natura* e na forma de sucos sorvetes e picolés. Entretanto, muitos aspectos como a quantificação da diversidade, aspectos nutricionais do coquinho-azedo não foram estudados. Diante do exposto objetivou-se com este trabalho identificar e quantificar a diversidade genética de quatro populações naturais e fragmentadas de *B. capitata* no norte de Minas Gerais, Brasil e uma coleção situada no ICA (Instituto de Ciências Agrárias), utilizando marcadores ISSR (*Inter Simple Repeat*). Avaliar a composição nutricional de frutos maduros dessa palmeira em diferentes regiões e grupos de plantas do norte de Minas Gerais. Determinar o conteúdo de DNA e avaliar a qualidade das análises de citometria de fluxo em *B. capitata* de diferentes estruturas originadas a partir de várias fases da germinação *in vitro* de embriões zigóticos, bem como caracterizar morfológica e anatomicamente o material estudado. Para tanto, foram realizados três estudos: no primeiro foram demarcadas cinco populações de coquinho-azedo, o DNA foi extraído das folhas e analisado por meio de marcadores ISSR. No segundo estudo foram coletados frutos maduros de quatro localidades do norte de Minas e de 24 plantas por localidade, onde se formaram grupos de plantas e os frutos foram caracterizados quanto à composição nutricional. Por fim, no último estudo o conteúdo de DNA e o coeficiente de variação foram determinados de estruturas formadas durante o processo germinativo de *B. capitata*, para tanto, foi montado um experimento com 16 tratamentos sendo embrião, pecíolo cotiledonar avaliados aos 8, 16 e 27 dias, haustório aos 8, 16 e 27 dias, radícula aos 16, 27 e 37 dias, e bainha aos 16, 27, e 37 dias, folha aos 37 dias e folha da planta adulta. Os resultados do primeiro estudo permitiram inferir que há maior diversidade dentro das populações, observou-se a formação de três grandes grupos, o primeiro com plantas das populações de Bonito de Minas, ICA e Abóboras, o segundo com plantas de ICA e Cristália e o terceiro com plantas de Cristália e Mirabela. No segundo estudo verificou-se que a polpa de *B. capitata* é bastante ácida e apresenta elevado teor de vitamina C, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante, entretanto, possui baixa quantidade de açúcares totais. A polpa de *B. capitata* possui elevada umidade e fibras e valores medianos de proteínas. O potássio e o ferro estão presentes em maiores quantidades na polpa de *B. capitata*. No último ensaio as estruturas pecíolo cotiledonar e haustório aos 8 dias do cultivo *in vitro* tiveram seu conteúdo de DNA alterados ao longo dos períodos de avaliação, apresentando altos coeficientes de variação. A bainha, pecíolo cotiledonar e radícula apresentam os menores coeficientes de variação e quantidades iguais de DNA, sendo essas estruturas as mais confiáveis para análise do tecido em *B. capitata*.

Palavras-chave: *Areaceae*. Diversidade genética. Caracterização nutricional. Citometria de Fluxo.

## ABSTRACT

*Butia capitata* is an endangered native palm of Cerrado popularly known as coquinho-azedo. Its fruits are widely consumed in the northern region of Minas Gerais mainly fresh and as juice, ice cream and popsicles. However, many aspects such as the quantification of genetic diversity and nutritional contents of coquinho-azedo were not studied. Given the above the aim of this work was to identify and quantify the genetic diversity of four natural and fragmented populations of *Butia capitata* in Northern Minas Gerais, Brazil and one collection located at the Institute of Agricultural Sciences (ICA) using ISSR markers. Evaluate the nutritional composition of ripe fruits of this palm in different regions and groups of plants in northern Minas Gerais. To determine DNA content and evaluate the quality of the analysis in flow cytometry of different structures originated from various stages of in vitro germination of zygotic embryos as well as characterize morphologically and anatomically the studied material. To this end, three studies were performed: in the first five populations of coquinho-azedo were delimited, DNA was extracted from leaves and analyzed by ISSR markers. In the second study ripe fruit of 24 plants per location from four locations in northern Minas were collected and the nutritional composition was characterized. Finally, in the last study the DNA content and the coefficient of variation were determined from structures formed during the germination of *Butia capitata*, therefore, was set up an experiment with 16 treatments, cotyledon petiole evaluated at 8, 16 and 27 days, haustorium at 8, 16 and 27 days, primary root at 16, 27 and 37 days, the sheath 16, 27, and 37 days, leaves at 37 days and leaves of the adult plant. The results of the first study allowed to infer that there is greater diversity within populations, we observed the formation of three major groups; one with plants of the populations of Bonito de Minas, ICA and Abóboras, a second with plants of ICA and Cristália and a third one with plants of Mirabela and Cristália. In the second study it was found that the pulp of *Butia capitata* is quite acid and has a high concentration of vitamin C, total phenolics and antioxidant capacity, however, has low amount of total sugars. The pulp of *Butia capitata* has high humidity and median values of fiber and protein. The potassium and iron are present in larger amounts in pulp *B. capitata*. In the last essay cotyledon petiole structures and haustorium after 8 days of in vitro culture had its DNA contents changed over the evaluated periods showing high variation coefficients. The sheath, petiole and cotyledon radicle have lower coefficients of variation and equal amounts of DNA, being these structures the most reliable for tissue analysis in *Butia capitata*.

Keywords: *Arecaceae*. Genetic diversity. Nutritional characterization. Flow Cytometry.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Distribuição geográfica das populações de *Butia capitata* oriundas dos municípios de Bonito de Minas (B), Mirabela (M), Abóboras (A), ICA (I) e Cristália (C) no norte de Minas Gerais ..50
- Figura 2 Representação pelo agrupamento UPGMA, dissimilaridade genética pelo coeficiente de Jaccard (1908) de diferentes populações de *Butia capitata* oriundas dos municípios de Bonito de Minas (B), Mirabela (M), Abóboras (A), ICA (I) e Cristália (C) no norte de Minas Gerais.....56
- Figura 3 Análise de coordenadas principais (ACoP) para as diferentes populações de *Butia capitata* oriundas dos municípios de Bonito de Minas, Mirabela, Abóboras, ICA e Cristália no Norte de Minas Gerais.....58
- Figura 4 Inferência *Bayesiana* para as populações de *Butia capitata* oriundas dos municípios de Bonito de Minas (B), Mirabela (M), Abóboras (A), ICA (I) e Cristália (C) no Norte de Minas Gerais com K=4 ..... 61
- Figura 1 Histogramas de citometria de fluxo para quantificação de DNA. A) embrião; (B) folha aos 37 dias pós-cultivo; (C) folha da planta adulta; (D) pecíolo cotiledonar aos 37 dias; (E) bainha aos 37 dias; (F) haustório 8 dias; (G) pecíolo cotiledonar aos 8 dias ..... 120
- Figura 2 Estrutura das plântulas e germinação *in vitro* de *Butia capitata* Secções longitudinais (B,C, E); (A) plântula aos 8 dias; (B) base do pecíolo cotiledonar com faixa fenólica e a raiz aos 8 dias; (C) haustório aos 8 dias; (D) plântula aos 16 dias; (E) Raiz; (F) plântula 30 dias; (G) plântula 37 dias. (b1: primeira bainha; b2: segunda bainha; co: coifa; cx: córtex; ep: epiderme; fo: folha; fl: floema; If: idioblastos fenólicos; ha: haustório; pa: parênquima; pc: pecíolo cotiledonar; rp: raiz primária; xi: xilema)..... 121

Figura 3 Crescimento em comprimento das partes da plântula de coquinho-azedo até os 37 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	123
Figura 4 Crescimento em diâmetro das partes da plântula de coquinho-azedo até os 37 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	123

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Coordenadas geográficas de populações de <i>Butia capitata</i> e números de plantas amostradas em quatro localidades do norte de Minas Gerais .....	50
Tabela 2	Sequências e número de bases de iniciadores ISSR, temperatura de anelamento para reação de PCR utilizadas em estudo de populações de <i>Butia capitata</i> oriundas do norte de Minas Gerais.....	52
Tabela 3	Estimativas de distância genética e geográfica em (Km) de diferentes populações de <i>Butia capitata</i> oriundas dos municípios de Bonito de Minas, Mirabela, Abóboras, ICA e Cristália no norte de Minas Gerais.....	57
Tabela 4	Análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro de diferentes populações de <i>B. capitata</i> oriundas dos municípios de Bonito de Minas, Mirabela, Abóboras, ICA e Cristália no norte de Minas Gerais .....	58
Tabela 5	Índice de Shannon (I), diversidade genética ( $H_e$ ) e porcentagem de bandas polimórficas (P%) de diferentes populações de <i>Butia capitata</i> oriundas dos municípios de Bonito de Minas, Mirabela, Abóboras, ICA e Cristália no norte de Minas Gerais .	59
Tabela 1	Grupos de plantas de <i>B. capitata</i> formados a partir de plantas georreferenciadas de quatro localidades no norte de Minas Gerais Abóboras, Mirabela, Bonito de Minas e Cristália .....	81
Tabela 2	Temperatura anual média e precipitação total do ano de 2011, para as quatro localidades com pomares de <i>Butia capitata</i> localizadas no norte de Minas Gerais. ....	82
Tabela 3	Resultados da análise química do solo de diferentes localidades de populações nativas de <i>Butia capitata</i> .....	82
Tabela 4	Fração do solo de diferentes localidades de populações nativas de <i>Butia capitata</i> .....	83

Tabela 5	pH, Brix, acidez titulável e ratio de polpas de <i>B. capitata</i> oriundas de diferentes grupos de plantas e populações do norte de Minas Gerais .....	88
Tabela 6	Açúcares totais, teor de vitamina C, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de polpas de <i>Butia capitata</i> oriundas de diferentes grupos de plantas e populações do norte de Minas Gerais .....	90
Tabela 7	Umidade, proteína e fibra bruta de polpas de <i>Butia. capitata</i> oriundas de diferentes grupos de plantas e populações do norte de Minas Gerais .....	94
Tabela 8	Fósforo, potássio e magnésio de polpas de <i>B. capitata</i> oriundas de diferentes grupos de plantas e populações do norte de Minas Gerais .....	97
Tabela 9	Cobre, manganês, zinco e ferro de polpas de <i>B. capitata</i> oriundas de diferentes grupos de plantas e populações do norte de Minas Gerais .....	98
Tabela 1	Conteúdo de DNA e coeficiente de variação (CV) de <i>Butia capitata</i> do embrião, plântulas cultivadas <i>in vitro</i> e folha da planta adulta.....	116

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	14
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
<b>2.1</b>	<b>O bioma Cerrado</b> .....	17
<b>2.2</b>	<b>Coquinho-azedo, caracterização, usos e localização</b> .....	19
<b>2.3</b>	<b>Importância dos nutrientes na alimentação humana</b> .....	20
<b>2.4</b>	<b>Diversidade genética e tipos de marcadores</b> .....	23
<b>2.5</b>	<b>Marcadores moleculares na diversidade</b> .....	27
<b>2.6</b>	<b>Citometria de fluxo</b> .....	32
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	35
	<b>SEGUNDA PARTE</b> .....	43
	<b>Artigo 1: Diversidade genética de populações de <i>Butia Capitata</i></b> <b>ameaçadas de extinção: implicações para a conservação</b> .....	43
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	46
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	49
<b>2.1</b>	<b>Caracterização das populações</b> .....	49
<b>2.2</b>	<b>Extração do DNA e amplificação por meio de marcadores ISSR</b>	50
<b>2.3</b>	<b>Análise estatística dos dados</b> .....	52
<b>3</b>	<b>RESULTADO</b> .....	54
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	62
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	69
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70
	<b>Artigo 2: Composição nutricional de frutos de <i>Butia capitata</i> de</b> <b>diferentes plantas coletadas em quatro localidades</b> .....	76
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	79
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	81
<b>2.1</b>	<b>Obtenção dos frutos</b> .....	81
<b>2.2</b>	<b>Análises Físicas e químicas</b> .....	83
<b>2.3</b>	<b>pH e acidez titulável</b> .....	83

2.4	Sólidos solúveis e Razão entre sólidos solúveis totais (STT), acidez titulável (ATT).....	83
2.5	Determinação da umidade nutrientes .....	84
2.5.1	Umidade.....	84
2.5.2	Fibra Bruta.....	84
2.5.3	Proteína Bruta .....	84
2.5.4	Análise de minerais.....	84
2.6	Açúcares totais .....	85
2.7	Vitamina C .....	85
2.8	Compostos fenólicos totais .....	85
2.9	Atividade antioxidante .....	86
3	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	87
4	CONCLUSÃO.....	100
	REFERÊNCIAS .....	101
	Artigo 3: Conteúdo de DNA de estruturas de germinação <i>in vitro</i> de embriões de <i>Butia capitata</i> .....	106
1	INTRODUÇÃO .....	109
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	111
2.1	Cultivo <i>in vitro</i> .....	111
2.2	Estimativa do conteúdo de DNA por citometria de fluxo .....	112
2.3	Análises biométricas .....	113
2.4	Anatomia das plântulas e embriões .....	113
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	115
4	CONCLUSÕES.....	124
	REFERÊNCIAS .....	125

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

O coquinho-azedo [*Butia capitata* (Mart.) Becc.] é uma palmeira nativa do Cerrado, sendo seus frutos amplamente consumidos *in natura* na região norte de Minas Gerais e utilizados na fabricação de polpas, sucos, licores, sorvetes. Essa espécie está localizada nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás e encontra-se preferencialmente margeando rios. Devido à expansão das fronteiras agrícolas ocorrida no Cerrado nos últimos anos e ao extrativismo intensivo dos frutos, essa espécie está ameaçada de extinção.

Sendo assim, é necessário elaborar uma estratégia de manejo e conservação para a espécie que promova um maior conhecimento das populações nativas e contribua para a domesticação dessa frutífera, favorecendo a sua conservação em campo e a recuperação de áreas com essa palmeira para que os agricultores, os extrativistas e as comunidades continuem a usufruir dos benefícios dessa palmeira.

Até o momento os estudos realizados com *B. capitata* se concentraram na elaboração de protocolos para a propagação dessa frutífera e na formação de pomares experimentais. No que se refere à quantificação da diversidade genética de *B. capitata* nenhum estudo foi realizado até o momento e esses trabalhos são importantes, porque servem de base para planos de conservação e manejo da espécie, formação de bancos de germoplasma e futuros programas de melhoramento, além de demonstrar o estado atual das populações nativas.

Outro aspecto que foi pouco estudado refere-se à composição nutricional dos frutos de *B. capitata*. Os frutos dessa palmeira constituem-se de uma drupa oval de epicarpo com coloração amarela, vermelha ou roxa, são produzidos de setembro a janeiro e com pico de produção em novembro. Apresenta polpa carnosa e fibrosa sendo amplamente comercializados em feiras, no comércio, supermercados, além de constituírem parte da merenda

em escolas e creches da região. Portanto, há necessidade de maior conhecimento da composição nutricional dos frutos, a avaliação de diferentes localidades e mesmo de diferentes plantas, pois essas informações são muito úteis na elaboração de planos de dietas e informações nutricionais dos frutos.

A citometria de fluxo também pode contribuir com a caracterização de espécies vegetais, pois por meio dessa ferramenta é possível verificar o conteúdo de DNA, ciclo celular, análises de ploidia, detecção de plantas haploides e de linhas di-haploides, detecção de híbridos interespecíficos, controle da estabilidade do nível de ploidia, verificação de aneuploidia e taxonomia. Entretanto, para que os resultados sejam confiáveis dois aspectos devem ser averiguados para a análise do tecido vegetal. O protocolo de análise deve estar bem padronizado favorecendo a geração de histogramas com picos mais finos e baixos coeficientes de variação, além da caracterização e tipo de material utilizado nas análises. A parte do vegetal mais utilizada em citometria de fluxo são as folhas, entretanto, outras partes do vegetal também podem ser utilizadas como raízes, calos e sementes. Faz-se necessário, portanto, verificar a autenticidade e confiabilidade dessas estruturas na quantificação do conteúdo de DNA.

Até o momento, a exploração de *B. capitata* tem sido artesanal, com pequena eficiência e exigindo grandes deslocamentos dos agricultores para a coleta dos frutos. Além disso, esse tipo de exploração extrativista pode gerar perdas de material genético, pois, em função dos ótimos preços, quase todos os frutos de alta qualidade originados de genótipos superiores são coletados, impedindo assim a reprodução natural a partir desses. Dessa forma, a possibilidade da perda de plantas com frutos de alto valor nutricional e econômico, aliada à preocupação com a conservação dessas espécies, justifica uma exploração mais racional. Essa exploração racional torna-se ainda mais importante, uma vez que ela pode significar uma importante fonte de renda, levando os agricultores a reduzirem o ritmo das suas atividades agropecuárias sobre as vazantes, veredas e regiões de matas



ciliares, passando a utilizar, de forma mais rentável e sustentável, essa frutífera do cerrado.

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho identificar e quantificar a diversidade genética de quatro populações naturais e fragmentadas de *B. capitata* no norte de Minas Gerais, Brasil e uma coleção situada no Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da UFMG utilizando marcadores ISSR e avaliar a composição nutricional de frutos maduros dessa palmeira em diferentes regiões e grupos de plantas do norte de Minas Gerais. Determinar o conteúdo de DNA e avaliar a qualidade das análises de citometria de fluxo em *B. capitata* de diferentes estruturas originadas a partir de várias fases da germinação *in vitro* de embriões zigóticos, bem como caracterizar morfológica e anatomicamente o material estudado.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O bioma Cerrado

O bioma Cerrado ocupa uma área de mais de 204, 7 milhões de hectares equivalente a 2 milhões de Km<sup>2</sup> na parte central do país e abrange os estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Piauí, São Paulo e Tocantins (SANO et al., 2010).

Grande parte desse bioma é composta por relevos planos e solos profundos (latossolos) o que favorece a mecanização e a agricultura (FEARNSIDE, 2001). O clima predominante é o tropical sazonal caracterizado por inverno seco e verão chuvoso com temperaturas médias anuais em torno de 22-23°C. A precipitação média anual é bastante heterogênea e varia entre 1200 e 1800 mm. No período de maio a setembro, os índices pluviométricos mensais reduzem-se bastante e a umidade relativa do ar permanece entre 10 e 30%, podendo ocorrer secas prolongadas (BRASIL, 2009). A estação chuvosa concentra-se nos meses de outubro a março.

Os recursos hídricos são compostos por uma extensa malha de rios. Três dos principais rios brasileiros têm suas nascentes presentes nesse bioma (São Francisco, Tocantins-Araguaia e Paraná). Ainda no Cerrado estão presentes oito das doze bacias hidrográficas brasileiras (OLIVEIRA FILHO; LIMA, 2002).

A vegetação do Cerrado é bastante heterogênea. São descritos onze tipos fitofisionômicos distribuídos em três classes, sendo eles: formações florestais: compostas por Mata Ciliar, Mata de Galeria, Mata Seca e Cerradão; formações savânicas: Cerrado *sensu strictu*, Parque de Cerrado, Palmeiral e Veredal e Formações campestres: Campo Sujo, Campo Rupestre e Campo Limpo. Cada qual com uma vegetação característica, que vão desde florestas associadas a cursos-d'água, passando por estratos arbóreos e arbustivo-herbáceo, definidos com as árvores distribuídas aleatoriamente

sobre o terreno em diferentes densidades (BRASIL, 2007). Esse bioma é considerado a mais rica savana tropical em todo o mundo, apresentando grande diversidade de habitats e espécies dos 44% de vegetais endêmicos, 12% estão presentes no Brasil, já para os mamíferos, pássaros, répteis e anfíbios a porcentagem de endemismo chega a 9,5%, 3,4%, 17% e 28% respectivamente (KLINK; MACHADO, 2005).

Há no cerrado diversos usos, sendo o principal a agricultura para a produção de grãos e pastagens (PHALAN et al., 2013). Aproximadamente 80 milhões de hectares foram utilizados para essas finalidades, o que corresponde a 56% de terras adequadas para a agricultura intensiva, somente nos estados de Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul mais de 35,8 milhões de hectares são ocupados por pastagens (SANO et al., 2010). Por ser rico em diversidade de vegetais várias espécies são utilizadas nos mais diversos fins, sendo as principais a alimentação por populações locais que utilizam frutos, raízes, folhas como matéria-prima na fabricação de polpas, licores, produção de óleos, ceras, fármacos, cosméticos e ornamentos (OLIVEIRA et al., 2012; SOUZA JÚNIOR et al., 2013). Os produtos obtidos contribuem para a geração de emprego e renda de agricultores, camponeses e extrativistas, que comercializam seus produtos em feiras e comércios locais (COULY; SIST, 2013).

Entretanto, devido principalmente a essa expansão agrícola, que promoveu a remoção de extensas áreas nativas, bem como por meio de práticas de produção como a aplicação intensiva de agroquímicos (fertilizantes, inseticidas, herbicidas) remoção do solo, contaminação e esgotamentos de recursos hídricos (KLINK; MACHADO, 2005), esse bioma foi incluso em áreas prioritárias para a conservação, sendo uma das 25 regiões de *hotspots* mundiais (SANO et al., 2010). Dados do Ministério do Meio Ambiente evidenciam o rápido desmatamento entre os anos de 2002 a 2008 cerca de 85.074 km<sup>2</sup> de vegetação foram removidas o que representa uma taxa anual naquele período de 14.200 km<sup>2</sup>/ano (BRASIL, 2009). Além disso, o bioma Cerrado sofre com a exploração extremamente predatória de

seu material lenhoso para produção de carvão. Apenas 1,4% do bioma Cerrado encontram-se preservados, dos quais 1,7 milhões de hectares são campos, 764.000 ha de florestas e 413 mil hectares de pastagens naturais estão totalmente protegidos em 15 parques nacionais. Machado et al. (2004) ressaltam que mais de 20% das espécies endêmicas e ameaçadas permanecem externas a parques e reservas florestais.

## **2.2 Coquinho-azedo, caracterização, usos e localização**

O coquinho-azedo *Butia capitata* (Mart.) Becc. família *Arecaceae* também conhecido como coco cabeçudo é uma palmeira nativa do bioma Cerrado. Segundo Jones (1995), essa frutífera pertence à subfamília *Arecoideae*, tribo *Cocoeae* e subtribo *Butiinae*. Essa espécie é comumente encontrada em áreas próximas a rios, veredas ou regiões de chapada (AMARAL, 2011) e está distribuída nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás (LORENZI et al., 2010).

Apresenta como características gerais: folhas pinadas, arqueadas de coloração verde-acinzentadas e o caule é do tipo ereto ou estipe de aproximadamente 2,0 m de altura (LORENZI et al., 2010). A floração ocorre nos meses de maio a setembro com uma média 2,4 inflorescências por planta, que são protegidas por uma espata lenhosa. As inflorescências de coloração amarela são formadas por pedúnculo, um eixo central (ráquis), e ramificações laterais (ráquias), nas quais estão inseridas flores unissexuais. As flores femininas encontram-se apenas na região basal da ráquila, sendo essas rodeadas por duas masculinas e nessa região observa-se dicogamia do tipo protandria, uma vez que a antese das flores masculinas ocorre antes da maturação das flores femininas (MERCADANTE-SIMÕES et al., 2006).

A frutificação dessa espécie ocorre nos meses de novembro a janeiro com um pico de produção em dezembro, os frutos drupas comestíveis com epicarpo na coloração amarela, roxo ou vermelha-arroxeadada (MOURA et al., 2010) apresentam polpa firme e bastante fibrosa com comprimento

longitudinal em média de 26 mm e 11 mm de diâmetro equatorial (MOURA et al., 2008). No interior do fruto há um pirênio de formato oval composto por endocarpo rígido, lenhoso e lignificado, de coloração marrom enegrecida, apresentando três poros germinativos. O pirênio pode conter de uma até três sementes, que apresentam formato alongado com o endosperma, ocupando quase toda a cavidade da semente e é denso, rígido, com coloração esbranquiçada e brilhante (MAGALHÃES et al., 2013).

A essa palmeira são atribuídos diversos usos, como o principal a alimentação, no consumo *in natura* e bebida na forma de suco, também é utilizado no preparo de polpas, doces e licores. Com as folhas são produzidas vassouras e chapéus essas comumente utilizadas para prensar farinhas por comunidades locais (AMARAL, 2011). A árvore é usada em projetos de jardinagem e paisagismo, possuindo grande valor ornamental. Além disso, pode ser usada em programas ambientais, principalmente em áreas para a recuperação de matas ciliares, uma vez que essa espécie é típica de locais próximos às margens dos rios e córregos, fornecendo, assim, também alimento para a fauna (MAGALHAES, 2013). A polpa amplamente procurada e valorizada na região é fonte de renda para pequenos agricultores e extrativistas, a qual é amplamente comercializada no comércio local, escolas, creches, hospitais e restaurantes populares. Cerca de 80% da produção recente de cooperativas da região norte de Minas Gerais foi adquirida por esse mercado, seja via Programa de Aquisição de Alimentos (PAA) ou pela negociação direta com prefeituras (SANTOS; SANTA ROSA, 2005).

### **2.3 Importância dos nutrientes na alimentação humana**

As dietas ricas em frutas e vegetais são amplamente recomendadas pelas suas propriedades promotoras para a saúde. Frutas e vegetais têm ocupado um lugar de destaque na dieta em função de suas concentrações de vitaminas, em especial vitaminas C e A; minerais, e, mais recentemente

fitoprodutos químicos, especialmente antioxidantes. Além disso, frutas e vegetais são excelentes em fonte de fibra (SLAVIN; LLOYD, 2003). No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu uma resolução com a ingestão diária de nutrientes para adultos, crianças, mulheres grávidas e adolescentes. Uma dieta balanceada correta é capaz de trazer inúmeros benefícios à saúde humana, pois diminui o estresse, ansiedade, irritabilidade, facilita o controle de peso e humor. Além disso, auxilia também no controle de diversas doenças e favorece a recuperação mais rápida. Para quem pratica esportes traz melhorias em seus rendimentos, além de potencializar o desenvolvimento físico e cognitivo.

Cada nutriente exerce uma função específica no organismo humano podendo ser reguladora, construtora, energética ou catalizadora. Dentre os nutrientes destacam-se as proteínas que exercem vários empregos no organismo destacando-se dentre eles as funções estruturais, pois são constituintes básicos de fibras musculares, cabelo, ossos, dentes e pele; catalisadores como as enzimas importantes em acelerar reações bioquímicas; reguladores do metabolismo e sistema imunológico. Já as fibras alimentares formam um conjunto de substâncias derivadas de vegetais resistentes à ação das enzimas digestivas humanas. Podem ser classificadas em fibras solúveis e fibras insolúveis, conforme a solubilidade de seus componentes em água. A maior parte das pectinas, gomas e certas hemiceluloses são fibras solúveis, enquanto celulose, algumas pectinas, grande parte das hemiceluloses e lignina são fibras insolúveis (MATOS; MARTINS, 2000). As fibras são responsáveis, por exemplo, pelo aumento da viscosidade do conteúdo intestinal e redução do colesterol plasmático, aumentam o volume do bolo fecal, reduzem o tempo de trânsito no intestino grosso, e tornam a eliminação fecal mais fácil e rápida. As fibras regularizam o funcionamento intestinal, o que as torna relevantes para o bem-estar das pessoas saudáveis e para o tratamento dietético de várias patologias (MATOS; MARTINS, 2000).

Os compostos fenólicos apresentam um grupo hidroxila, ligado a um anel aromático. Podem ser sintetizados nas plantas a partir de duas rotas: uma do ácido chiquímico e outra do ácido mevalônico, tendo como subclasses os flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, ligninas, xantonas (ALMEIDA, 1988).

Os compostos fenólicos exibem inúmeras propriedades fisiológicas, tais como antialérgicos, anti-inflamatórios, antimicrobianos, antioxidantes, cardioprotetores e vasodilatadores e antitrombóticos. Os compostos fenólicos têm sido associados com os benefícios para a saúde decorrentes do consumo de altos níveis de frutas e vegetais. Os flavonoides constituem o maior grupo dos compostos fenólicos, sendo responsável por mais da metade de oito mil compostos fenólicos que ocorrem naturalmente (GIADA; MANCINI FILHO, 2006). A atividade antioxidante de muitos compostos fenólicos é, essencialmente, resultado da facilidade com a qual um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxil (OH) da sua estrutura aromática é doado para um radical livre. Entre os compostos fenólicos da dieta com uma reconhecida atividade antioxidante, destacam-se os flavonoides, taninos, chalconas, cumarinas e os ácidos fenólicos (GIADA; MANCINI FILHO, 2006). A atividade antioxidante dessas substâncias é de interesse nutricional, uma vez que tem sido associada à potencialização de efeitos promotores da saúde.

A vitamina C ou ácido ascórbico é uma molécula necessária na hidroxilação de várias outras em reações bioquímicas nas células. Essa vitamina desempenha vários papéis, sendo importante na síntese de colágeno, hormônio, neurotransmissores e o metabolismo de alguns aminoácidos e outras vitaminas. Auxilia o fígado na desintoxicação de substâncias tóxicas e no combate a infecções, além de ser um excelente composto antioxidante (WALINGO, 2005).

Os sais minerais são substâncias inorgânicas que precisam ser consumidas para que haja um bom funcionamento do organismo. A falta desses nutrientes pode causar graves prejuízos ao organismo, até mesmo a

morte. Os sais minerais podem ser encontrados de três formas nos organismos vivos: na forma de íons; na forma de cristais ou associados a moléculas orgânicas. A ANVISA recomenda a ingestão de 700 mg/dia de fósforo, cálcio 1000 mg/dia, magnésio 260 mg/dia, ferro 14 mg/dia, zinco 7 mg/dia. A deficiência desses minerais pode trazer sérios prejuízos à saúde humana. O fósforo tem a função de tamponar sistemas ácidos ou alcalinos, auxiliando na manutenção do pH, no armazenamento temporário de energia provinda do metabolismo de macronutrientes, na forma de adenosina trifosfato (ATP), além de ser responsável pela ativação, por meio da fosforilação de diversas cascatas enzimáticas (COZZOLINO, 2007).

Já a deficiência de ferro pode causar anemia nutricional, raquitismo, menor resistência a infecções. A deficiência de zinco pode causar atraso no crescimento, dermatite, diarreia. O magnésio participa na formação e utilização de ligações químicas ricas em energia que são à base de toda a atividade biológica na célula. O magnésio é indispensável tanto para a síntese e nas reações de ação do ATP, e mais enzimáticas dependendo ATP precisam de magnésio, seja para carboidratos, lipídios, nuclear, ou o metabolismo de proteínas. Sua deficiência é geralmente ligada a Espasmofilia, um estado caracterizado por tetania sem cálcio ser quantitativamente baixa no organismo (BOURRE, 2006).

#### **2.4 Diversidade genética e tipos de marcadores**

A avaliação da diversidade genética dos vegetais é um importante parâmetro para a definição de programas de manejo e conservação de espécies, principalmente para aquelas sob forte pressão antrópica (CIAMPI et al., 2007; VARSHNEY; GRANER; SORRELLS, 2005). Esses estudos permitem a distinção de populações, além de indicar indivíduos superiores que tenham elevado potencial agrônomico, desde a produção de frutos em qualidade e quantidade, a resistência a pragas e doenças, precocidade de produção, dentre outras. Com a expansão da produção agrícola,



principalmente, em áreas nativas, muitas espécies de elevado potencial ambiental, econômico e social encontram-se ameaçadas. Esse quadro se agrava diante de espécies que são endêmicas em determinados biomas. Tornam-se urgentes estudos que atestem parâmetros genéticos nessas populações, pois muito material interessante vem sendo perdido. Namkoong et al. (1996) relatam que a sobrevivência e a evolução de espécies a longo prazo dependem da diversidade genética. Portanto, o conhecimento do estado atual de diversidade de recursos genéticos florestais é importante para a geração de programas de conservação, domesticação de plantas nativas, formação de bancos de germoplasma e programas de melhoramento genético (VARSHNEY; GRANER; SORRELLS, 2005).

Existem três tipos de marcadores, que podem ser utilizados para avaliar a diversidade genética vegetal, cada um apresentando suas especificidades, vantagens e desvantagens. Os marcadores morfológicos são características fenotípicas de fácil visualização como cor, formato, altura, entretanto, podem ser facilmente modificados por condições ambientais e seu uso deve ser restrito principalmente para interferência ambiental (KUMAR et al., 2009).

Outra classe de marcadores são os bioquímicos caracterizados pelas isoenzimas, as quais são variantes alélicas de enzimas codificadas por genes estruturais. Devido ao fato das enzimas apresentarem cargas elétricas decorrente do segmento de aminoácido que as origina. Na ocorrência de uma mutação no DNA um aminoácido é substituído, o que pode ocasionar alteração da carga elétrica da proteína e a conformação da molécula. Portanto, as alterações nas cargas elétricas, bem como a conformação das enzimas podem alterar a taxa de migração das proteínas em um campo elétrico, sendo assim possível averiguar a variação alélica por meio da eletroforese (KESAWAT; KUMAR, 2009; KUMAR et al., 2009). As isoenzimas são marcadores bioquímicos codominantes. A análise pode ser realizada em qualquer tecido e fase do ciclo de vida de um organismo, incluindo herbário e tecidos mumificados. Entretanto, possuem número

limitado (Rafalski et al. 1996) e são influenciados por condições ambientais, estágio de desenvolvimento e especificidade do tecido (KUMAR, 1999). Izoenzimas foram utilizadas por Sawazaki et al. (1998) para verificar a diversidade de palmeiras do gênero *Euterpe*, *Bactris*, *Syagrus* e *Elaeis*. Neste estudo foram utilizados sete sistemas enzimáticos: fosfoglucoisomerase (PGI), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), esterase (EST), leucinoaminopeptidase (LAP), fosfatase ácida (ACP), peroxidase (PRX) e fosfogluco mutase (PGM). Outros trabalhos com izoenzimas para palmeiras foram realizados por Ballvé (1988) em *E.edulis* e *E. oleracea* e seus respectivos híbridos. Torres e Tisserat (1980) avaliaram sete genes, especificando cinco sistemas enzimáticos, álcool desidrogenase (ADH), EST, GOT, PGI e PGM em *E. guineensis*.

Em função dos marcadores morfológicos e bioquímicos serem influenciados pelo meio ambiente e estágio de desenvolvimento dos tecidos, os marcadores moleculares têm sido utilizados como método de análise genética em estudos populacionais (MOHAMMADI; PRASANNA, 2003; RAFALSKI et al., 1996). Sequências diferentes de DNA são caracterizadas molecularmente. A interpretação dos resultados é feita por meio de diferentes medidas de dissimilaridade visualizada por métodos de agrupamento (VICENTE et al., 2005). Portanto, essa técnica apresenta vantagens em relação ao uso de marcadores morfológicos e bioquímicos, os quais não detectam a variação no nível de DNA.

Define-se por marcadores moleculares diferenças nas sequências de nucleotídeos do DNA na posição correspondente ao cromossomo homólogo de dois indivíduos diferentes, que seguem um padrão de herança mendeliana (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008; KESAWAT; KUMAR, 2009). Os marcadores moleculares podem ou não ser correlacionados a expressão de uma característica fenotípica. Algumas propriedades são desejáveis para um bom marcador, sendo a principal a necessidade: ser altamente polimórfico, possuir herança codominante, ou seja, possibilidade de distinguir os indivíduos heterozigotos dos homozigotos; ser uniforme e

distribuído por todo o genoma, ser de custo barato para se detectar, necessitar de pequenas quantidades de DNA no momento da análise, ter alta reprodutibilidade, fácil troca de dados entre laboratórios e não necessitar de informações prévias sobre o genoma de um organismo (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008; KESAWAT; KUMAR, 2009).

Os marcadores moleculares oferecem inúmeras vantagens em relação às alternativas convencionais baseadas em fenótipo, pois como eles são ilimitados, estáveis e detectáveis em todos os tecidos independentemente do estado de crescimento, diferenciação e desenvolvimento, esses não são influenciados pelo meio ambiente - efeitos epistáticos e pleiotrópicos (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008; KUMAR, 1999). Os vários marcadores moleculares podem ser classificados em diferentes grupos com base em seu modo de ação gene (marcadores dominantes ou codominante) e método de análise baseado em hibridização ou marcadores baseados em *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (SEMAGN; BJØRNSTAD; NDJIONDJOP, 2006). Na análise por hibridação os fragmentos de DNA são cortados em sequências específicas com auxílio de enzimas de restrição. Na PCR é reproduzida e replicação do DNA *in vitro*, iniciadores se ligam arbitrariamente em sequências específicas do DNA, para em seguida o DNA polimerase realizar a polimerização dos nucleotídeos. Os fragmentos amplificados são separados electroforeticamente e os padrões de bandas diferentes são detectados por métodos, tais como a coloração e autorradiografia (KESAWAT; KUMAR 2009).

As principais vantagens da técnica de PCR em comparação com o método baseado em hibridação são: necessidade de uma pequena quantidade de DNA e eliminação do uso de radioisótopos, a metodologia é de fácil acesso para pequenos laboratórios em termos de equipamentos, instalações e custo, não é necessário conhecer a sequência prévia do genoma para realização das análises de AP-PCR, RAPD, DAF, AFLP, e ISSR, apresenta alto polimorfismo e permite a capacidade de rastrear simultaneamente muitos genes (WOLFE; LISTON, 1998).

Essas vantagens, no entanto, podem variar dependendo da técnica escolhida pelo pesquisador. As várias técnicas baseadas em PCR são de dois tipos, dependendo dos iniciadores utilizados para a amplificação em sequência arbitrária ou semiarbitrária que se desenvolveu sem informação de sequências prévias no genoma (por exemplo, AP-PCR, DAF, RAPD, AFLP, ISSR) já as técnicas (EST, CAPS, SSR, SCAR, STS) necessitam de sequências conhecidas de DNA (SEMAGN; BJØRNSTAD; NDJIONDJOP, 2006). Portanto, não existe um marcador ideal que contemple todas essas características e propriedades unicamente, as vantagens e desvantagens devem ser averiguadas e definidas conforme os objetivos do estudo.

Para as culturas perenes, como é o caso das palmeiras o uso de marcadores moleculares apresentam grande importância devido ao progresso no melhoramento de uma cultura ser muitas vezes dificultado pelo seu longo período de produção (UPADHYAY et al., 2004). Segundo Jamnadass, Lowe e Dawson (2009) para essas espécies locais e não domesticadas, os marcadores moleculares são importantes ferramentas no sentido de mensurar a diversidade genética de populações sub-domesticadas, ou seja, que já sofreram ou vem passando por processo de domesticação, e que em alguns casos podem gerar depressão por endogamia, limitando a produtividade, com menor oferta de sementes e frutos, menor vigor das mudas e crescimento da progênie. O que significa que essas árvores podem render menos do que os seus pais na maturidade. Sendo assim, uma compreensão aprofundada dos atuais níveis de variação genética e o fluxo gênico entre populações de árvores frutíferas torna-se essencial para determinar não haver intervenções e infusões para complementar a variação existente (JAMNADASS; LOWE; DAWSON, 2009).

## **2.5 Marcadores moleculares na diversidade**

O primeiro marcador molecular desenvolvido foi o RFLP *Restriction Fragment Length Polimorfism*. Essa técnica baseia-se, principalmente, em

uma classe especial de enzimas, denominadas enzimas de restrição, as quais revelam uma diferença de padrão entre tamanhos dos fragmentos de DNA em organismos individuais. Embora dois indivíduos da mesma espécie apresentem genomas quase idênticos, sempre serão diferentes em alguns nucleotídeos devido a um ou mais das seguintes causas: mutação, inserção/deleção, translocação, inversão e duplicação. Algumas das diferenças nas sequências de DNA aos sítios de restrição podem resultar em ganhos, perdas, ou realocização de um local de restrição. Assim, a digestão do DNA com as enzimas de restrição resulta em fragmentos cujo número e o tamanho pode variar entre indivíduos, populações, e espécies (KESAWAT; KUMAR, 2009). A técnica não é muito amplamente utilizada porque é demorada, cara e envolve reagentes radioativos/tóxicos, além de necessitar de grande quantidade de DNA genômico e também de alta qualidade. No entanto os marcadores RFLPs são moderadamente polimórficos e codominantes (AGARWAL et al., 2008). Por meio de RFLP Barcelos et al. (2002) conseguiram distinguir a espécie *Elaeis oleifera* da *Elaeis guineensis*, além de obter elevado número de fragmentos polimórficos no total de 278.

A amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD) é baseada nos pequenos segmentos de DNA, espalhados e invertidos ao longo de um genoma (RAFALSKI et al., 1996) o que lhes conferem alguma desvantagem, pois indivíduos heterozigotos não são diferenciados de indivíduos dominantes homozigotos e não é possível identificar heterozigotos em populações F2 (KUMAR, 1999). Entretanto, as desvantagens são compensadas por inúmeras vantagens, esse ainda é o método de escolha para muitos laboratórios devido a sua simplicidade, baixo custo e menor necessidade de infraestrutura (UPADHYAY et al., 2004) é acessível para não especialistas, exige quantidades muito pequenas de DNA e elimina uso da radioatividade (RAFALSKI et al., 1996). Esse tipo de marcador também é uma ferramenta, principalmente, para espécies nativas que não possuem *iniciadores* desenvolvidos para análises SRRs (JAMNADASS; LOWE; DAWSON, 2009). Na literatura, consta de inúmeros estudos de diversidade

genética para *Arecaceae*, por meio de marcadores (RAPD). Em *Butia odorata* dos 22 genótipos avaliados verificou-se grande diversidade genética (NUNES et al., 2008). Oliveira et al. (2007) observaram para 116 acessos de *Euterpe oleracea* ampla diversidade genética que foram geradas por 263 bandas polimórficas bem acima no número ideal. Com *Acrocomia aculeata* foi analisada a diversidade genética de populações de macaúba na região norte do estado de Minas Gerais encontrou-se altos níveis de diversidade genética dentro das populações estudadas. (OLIVEIRA et al., 2012). Outros trabalhos com palmeiras utilizando-se de marcadores RAPD evidenciaram a eficiência desse marcador em analisar a diversidade entre populações de palmeiras, sendo eles os estudos conduzidos por Sreekumar e Renuka (2006) para *Calamus thwaitesii*, *Cocus nucifera* (UPADHYAY et al., 2004), para a hibridação entre *Phoenix canariensis* e *Phoenix dactylifera* (GONZALEZ-PEREZ; CAUJAPE-CASTELLS; SOSA, 2004); *Trithrinax brasiliensis* (CIAMPI; SUJII; ALEGRIA, 2007); *Bactris gasipaes* (ARAÚJO et al., 2010) e *Oenocarpus Mapora* (MOURA; OLIVEIRA, 2012).

Para superar a limitação de reprodutibilidade associada com RAPD a tecnologia AFLP foi desenvolvida e combinada com características da técnica de RFLP mantendo a flexibilidade da tecnologia baseada em PCR (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008). A análise envolve a digestão do DNA genômico (cerca de 500 ng) com uma combinação de enzimas (EcoRI ou PstI), seguidas de adaptadores, amplificação seletiva dos fragmentos via PCR, eletroforese em géis de alta resolução e visualização com gel de prata (SEMAGN; BJØRNSTAD; NDJIONDJOP, 2006). A técnica pode ser usada para distinguir indivíduos intimamente relacionados em nível de subespécies e também pode identificar genes. Apresenta como vantagens: ser altamente confiável e reprodutível, não necessita de qualquer informação sobre a sequência de DNA, é rico em informações devido à sua capacidade de analisar um grande número de locos polimórficos simultaneamente. Em contraste com a técnica de RAPD, as limitações de AFLP incluem a exigência de um maior número de passos na técnica, DNA

livre de compostos inibidores que interferem nas enzimas e como restrição exige a utilização de gel de poliacrilamida em combinação com sais de prata  $\text{AgNO}_3$  de coloração e são marcadores dominantes como RAPD (SEMAGN; BJØRNSTAD; NDJIONDJOP, 2006).

Com o gênero *Butia* o estudo de diversidade realizado para a caracterização das populações com marcadores AFLP revelou grande presença de locos polimórficos. Pela análise molecular da variância foi possível verificar que 83,68% da diversidade genética são atribuídas à variação entre populações e 13,67% são atribuídas às diferenças entre populações (BUTTOW et al., 2010). Em *Euterpe edulis* (palmeira nativa da mata atlântica), foram obtidos 429 fragmentos em 11 populações, os estudos permitiram correlacionar a distância genética com a distância geográfica o que provavelmente está ligado à fragmentação desse bioma (CARDOSO et al., 2000). Outros estudos realizados com marcadores AFLP foram conduzidos por Ashraf et al. (2005) para *Phoenix dactylifera* e por Gomes et al. (2011) para *Mauritia flexuosa*.

As ISSRs (*Inter Simple Sequence Repeats*) são fragmentos de DNA de cerca 100-3000 pb localizados adjacente e opostamente a regiões de microssatélites (KUMAR et al., 2009). As ISSRs usam *iniciadores* mais longos (15-30pb) em relação aos de RAPD (10 pb), que permitem o uso subsequente de elevada temperatura de anelamento que conduz a um maior rigor. Os produtos amplificados são geralmente de 200-2000 pb de comprimento e passíveis de detecção em gel de agarose. No entanto, não necessitam de informações prévias de sequência do genoma. A técnica é simples e rápida, marcadores ISSR geralmente apresentam alto polimorfismo, embora o nível de polimorfismo tenha demonstrado variar como em RAPD, a reprodutibilidade e a herança dominante são as principais limitações das ISSRs (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008). Alguns estudos de diversidade genética de palmeiras têm demonstrado que esse marcador é eficiente em detectar a diversidade existente nas populações, na separação de espécies e na correlação com características fenotípicas de

frutos. Hamza et al. (2012) verificaram formações de grupos distintos de palmeira *Phoenix dactylifera* e a correlação desse marcador na identificação de frutos macios a mais consistentes. Rossato et al. (2007) permitiram a confirmação da informação taxonômica botânica, agrupando as populações de *B. eriopatha* de sete locais, *B. yatay* de duas localidades, *B. odorata* de uma localidade, *B. capitata* de duas localidades e um grupo externo formado por uma população de *Syagrus romanzoffiana* e um híbrido entre *Butia* sp. e *Syagrus romanzoffiana*.

Os marcadores microssatélites ou sequências repetitivas simples (SSRs) são individualmente amplificadas por reação em cadeia da polimerase (MULLIS et al., 1986), utilizando-se pares de oligonucleotídeos e *iniciadores* específicos para o DNA que flanqueiam a sequência SSR. São úteis em várias aplicações, por sua natureza multialélica, herança codominante, abundância relativa e boa cobertura do genoma (RAFALSKI et al., 1996; VARSHNEY; GRANER; SORRELLS, 2005). Têm sido associados com os mais altos níveis de polimorfismo resultado do elevado número de locos SSR (MORGANTE; OLIVIERI, 1993; TAUTZ, 1989) tornando-os potencialmente a classe mais informativa de marcadores. A principal restrição do uso de marcadores microssatélites a partir de bibliotecas genômicas é o custo elevado e esforço necessário para se obter os *iniciadores*. Geralmente esse processo é demorado e caro necessitando de grandes números de clones para encontrar as regiões SSR (SEMAGN; BJØRNSTAD; NDJIONDJOP, 2006).

Para algumas espécies de palmeiras, trabalhos foram conduzidos para o desenvolvimento de *primes* SSR como em *Bactris gasipaes* (MARTINEZ et al., 2002) e *Chamaedorea elegans* (CIBRIAN-JARAMILLO et al., 2008). O uso de microssatélites em estudos de diversidade genética revelou altos níveis de polimorfismo para *C. nucifera* (RAJESH et al., 2008), *P. dactylifera* (ZEHDI et al., 2004), *Elaeis guineensis* (BILLOTTE et al., 2005), *Phoenix atlantica* (HENDERSON et



al., 2006), *B. gasipaes* (COUVREUR et al., 2006; UGALDE; URPI; ROCHA, 2008).

## 2.6 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo consiste da tecnologia que utiliza radiação a *laser*, fluxo hidrodinâmico, ótica, substâncias fluorescentes (fluorocromos) e recursos de informática para determinar algumas características estruturais e funcionais de células, protozoários e bactérias que fluem em uma suspensão líquida (OCHATT, 2008). Essa técnica teve início com Moldavan (1934) que desenvolveu um contador de células sob um microscópio ótico, no qual havia um detector fotoelétrico que registrava a passagem das células de acordo com a mudança da luz. Seu uso inicial na medicina deu-se na hematologia com a contagem celular, fórmula leucocitária, análise da medula óssea, dentre outros (LAGUADO, 2007). A citometria de fluxo é uma tecnologia de rápido crescimento e desenvolvimento, pois permite examinar muitas propriedades nas células em pequenos intervalos de tempo. Consiste de um excelente método que permite obter uma aproximação sensível, rápida e específica em diversas aplicações (LAGUADO, 2007).

A estimativa do conteúdo em DNA nuclear foi a primeira (HELLER, 1973) e continua a ser a principal utilização da citometria de fluxo em plantas. Para a análise de vegetais algumas modificações são necessárias no preparo da amostra. O tecido vegetal é obtido de folhas jovens e saudáveis, que são postas em placas de *petri* contendo um tampão, as folhas são então picotadas para a liberação dos núcleos intactos (GALBRAITH et al., 1983), as amostras são previamente filtradas em gaze e posteriormente em filtro milipore. A suspensão líquida, que contém os núcleos a analisar é introduzida no centro da câmara de fluxo. As partículas, que são forçadas a moverem-se, em fluido laminar (DOLEŽEL, 1997) e uma a uma intersectam um feixe de iluminação bastante intenso. Quando as partículas intersectam o feixe de luz, ocorre a emissão de fluorescência, cuja intensidade está

dependente das características das partículas (CÔRTE-REAL et al., 2002). Os fótons que são dispersos frontalmente vão ser recebidos e analisados por um fotodíodo (detector da dispersão frontal) e os que são dispersos ortogonalmente (90°) são recebidos por uma série de filtros ópticos e são analisados em tubos fotomultiplicadores (dispersão lateral e fluorescência) (CÔRTE-REAL et al., 2002). Os diferentes tipos de filtros ópticos (“*long-pass*”, “*short-pass*”, passagem de banda e espelhos dicróicos) dividem a emissão fluorescente permitindo a medição simultânea de vários corantes fluorescentes (DOLEŽEL, 1991).

Na agricultura a citometria de fluxo pode ser utilizada em diversos estudos como a determinação do conteúdo de DNA, na detecção de híbridos interespecíficos, que são muitas vezes utilizados para transferir características de interesse de uma espécie para outra, no controle da estabilidade do nível de ploidia, na detecção de aneuploidia, na taxonomia, em estudos do ciclo celular, na identificação de apomixia, em estudos de caracterização cariotípica, e na detecção de proteínas (OCHATT, 2008). Entretanto, para que haja confiabilidade nas análises há necessidade de um protocolo bem definido para cada espécie vegetal que contemple o tipo de material analisado, o tipo de tampão mais adequado, tempo de exposição do material ao tampão, quantidade e tipo de fluorocromo utilizado (OCHATT, 2008). Do contrário os resultados podem apresentar valores que não correspondem às quantidades verídicas de DNA da amostra analisadas.

Os estudos que contemplam a citometria de fluxo em palmeiras são escassos. Alguns trabalhos determinaram o conteúdo de DNA como no de Rival et al. (1997) com *Elaeis guineensis* que realizaram uma comparação do conteúdo de DNA de calos e plântulas obtidas *in vitro* e a partir de sementes. O tamanho do genoma de *E. guineensis*, foi de 3,76 pg. Em outro estudo com *E. guineensis* foram testados diferentes espécies-padrão para estimativa do conteúdo de DNA que variou conforme o padrão sendo para *Zea Mays* (4,72 pg), enquanto que o conteúdo de DNA foi menor quando se utiliza de soja (*Glycine max* . Polanka) 3,77 pg ou de tomate (*Lycopersicon*

*esculentum* cv. Stupicke ) (4,25pg ) como uma referência (SRISAWAT et al., 2005). Com *A. aculeata* por meio da citometria de fluxo estimou-se a quantidade da relação A-T e C-G no genoma dessa espécie que foi de 58,3% e 41,7% respectivamente (ABREU et al., 2011).

## REFERÊNCIAS

ABREU, I. S. et al. First karyotype, DNA C-value and AT/GC base composition of macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) –a promising plant for biodiesel production. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 59, p. 149–155, 2011. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=BT10245>>. Acesso em: 22 ago. 2013

AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 617-631, 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00299-008-0507-z#page-1>>. Acesso em: 22 ago. 2013.

ALMEIDA, F. L. S. **A alelopatia e as plantas**. Londrina: IAPAR, 1988. 60 p.

AMARAL, V. B. **Butia capitata e B. odorata**: anatomia foliar comparada e etnobotânica no norte de minas gerais. 2011. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2011.

ARAÚJO, M. C. et al. Genetic variability in the peach palm gene bank with RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 10, p. 211-217, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00122-003-1581-9#page-1>>. Acesso em: 22 ago. 2013.

ASHRAF, M. E. et al. Genetic analysis of Egyptian date (*Phoenix dactylifera* L.) Accessions Using AFLP Markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 52, n. 5, p. 601- 607, 2005. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s10722-004-0583-z#page-1>>. Acesso em: 22 ago. 2013.

BALLVÉ, R. M. L. **Isoenzimas como marcadores genéticos em palmitero (*Euterpe spp*)**. 1988. 95 p. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade de Campinas, Campinas, 1988.

BILLOTTE, N. et al. Microsatellite-based high density linkage map in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 110, p. 754–765, 2005. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00122-004-1901-8#page-1>>. Acesso em: 22 ago. 2013.

BOURRE, J. M. Effects of nutrients (in food) on the structure and function of the nervous system: update on dietary requirements For brain. Part 1: micronutrients. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 10, n. 5, p. 156-160, 2006.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade do Cerrado e Pantanal: áreas e ações prioritárias para conservação**. Brasília, 2007. 540 p. (Série Biodiversidade, 17).

BUTTOW, M. V. et al. Caracterização molecular de populações de *Butia capitata* (Arecaceae) do sul do Brasil através de marcadores AFLP. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p. 230-239, 2010.

CARDOSO, S. R. S. et al. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. populations estimated by AFLP analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, 1753–1760, 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-294x.2000.01056.x/pdf>>. Acesso em: 22 ago. 2013.

CIAMPI, A. Y.; SUJII, P. S.; ALEGRIA, M. R. M. Análise genética em populações de *Trithrinax brasiliensis* Mart. utilizando marcadores moleculares RAPD. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 558-560, 2007.

CIBRIAN-JARAMILLO, A.; HAHN, W. J.; DESALLE, R. Development of microsatellite markers of the Mexican understory palm *Chamaedorea elegans*, cross-species genotyping, and amplification in congeners. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 8, p. 322–324, 2008. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2156/10/65/>>. Acesso em: 22 ago. 2013.

COULY, C.; SIST, P. Use and knowledge of forest plants among the Ribeirinhos, a traditional Amazonian population. **Agroforestry Systems**, Dordrecht, v. 87, p. 543-554, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10457-012-9575-8#page-1>>. Acesso em: 25 set. 2013.

COUVREUR, T. L. P. et al. Close genetic proximity between cultivated and wild *Bactris gasipaes* Kunth revealed by microsatellite markers in Western Ecuador. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 53, p.1361–1373, 2006. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s10722-005-5033-z#page-1>>. Acesso em: 22 ago. 2013.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. São Paulo: Manole, 2007. p. 67-175.

FEARNSIDE, P. M. Soybean cultivation as a threat to the environment in Brazil. **Environmental Conservation**, Lausanne, v. 28, p. 23–38, 2002. Disponível em: <<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=74413>>. Acesso em: 12 jul. 2013.

GIADA, M. L. R.; MANCINI FILHO, J. Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v. 12, n. 4, p. 7-15, 2006.

GOMES, L. R. P. et al. Genetic diversity in natural populations of Buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 11, p. 216-223, 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1984-70332011000300003&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1984-70332011000300003&script=sci_arttext)>. Acesso em: 12 jul. 2013.

GONZALEZ-PEREZ, M. A.; CAUJAPE-CASTELLS, J.; SOSA, P. A. Molecular evidence of hybridisation between the endemic *Phoenix canariensis* and the widespread *P. dactylifera* with Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. **Plant systematics and evolution**, New York, v. 247, p. 165–175, 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00606-004-0166-7#page-1>>. Acesso em: 12 jul. 2013.

HAMZA, H. et al. Investigation of genetic variation in Tunisian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars using ISSR marker systems and their relation with fruit characteristics. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v. 36, p. 449-458, 2012. Disponível em: <<http://journals.tubitak.gov.tr/biology/issues/biy-12-36-4/biy-36-4-10-1107-12.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2013

HENDERSON, F. M. Morphology and anatomy of palm seedlings. **The Botanical Review**, New York, v. 72, n. 4, p. 273-329, 2006. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/kq447q1571584247/fulltext.pdf>>. Acesso em: 10 set . 2013.

JAMNADASS, R.; LOWE, A.; DAWSON, I. K. Molecular markers and the management of tropical trees: the case of indigenous fruits. **Tropical Plant Biology**, Cham, v. 2, p.1-12, 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s12042-008-9027-9#page-1>>. Acesso em: 10 set . 2013.

JONES, D. L. **Palms throughout the world**. Sydney: Smithsonian Institution, 1995. 410 p.

KESAWAT, M. S.; KUMAR, B. Molecular markers: it's application in crop improvement. **Journal Crop Science Biotechnology**, Seoul, v. 12, n 4, p. 169 -181, 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s12892-009-0124-6#page-1>>. Acesso em: 10 set . 2013.

KLINK, C.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Boston, v. 19, n. 3, p. 707–713, 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cbi.2005.19.issue-3/issuetoc>>. Acesso em: 25 set. 2013.

KUMAR, L. S. DNA markers in plant improvement: an overview. **Biotechnology Advances**, New York, v. 17, p. 143-182, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975098000184>>. Acesso em: 10 set . 2013.

KUMAR, P. et al. Potential of molecular markers in plant biotechnology. **Plant Omics Journal**, Lismore, v. 2, n. 4, p. 141-162, 2009. Disponível em: <[http://www.researchgate.net/publication/230734092\\_pradeep\\_2\\_4\\_2009\\_141\\_162/file/79e41503b0c942829fc.pdf](http://www.researchgate.net/publication/230734092_pradeep_2_4_2009_141_162/file/79e41503b0c942829fc.pdf)>. Acesso em: 10 set . 2013.

MAGALHÃES, H. M. et al. Structure of the zygotic embryos and seedlings of *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees**, Berlin, v. 27, n. 1, p. 273-283, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00468-012-0797-1#page-1>>. Acesso em: 25 set. 2013.

MATOS, L. L.; MARTINS, I. S. Consumo de fibras alimentares em população adulta. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 50-55, 2000. Disponível em: <[www.fsp.usp.br/rsp](http://www.fsp.usp.br/rsp)>. Acesso em: 26 jun. 2013.

MERCADANTE-SIMÕES, M. O. et al. Biologia reprodutiva de *Butia capitata* (Mart.) Beccari (Arecaceae) em uma área de cerrado no norte de Minas Gerais. **Unimontes científica**, Montes Claros, v. 8, n. 2, p. 311-316, 2006.

MOHAMMADI, S. A.; PRASANNA, B. M. Analysis of genetic diversity in crop plants – salient statistical tools and considerations. **Crop Science**, Madison, v. 43, p. 1235–1248, 2003. Disponível em: <<https://dl.sciencesocieties.org/publications/cs/abstracts/43/4/1235>>. Acesso em: 25 set. 2013.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 175-182, 1993. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-313X.1993.t01-9-00999.x/abstract>>. Acesso em: 25 set. 2013.

MOURA, E. F.; OLIVEIRA, M. S. P. Genetic diversity in a germplasm bank of *Oenocarpus mapora* (Arecaceae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 4, p. 4008-4018, 2012. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/950687/1/gmr2315.pdf>>. Acesso em: 18 out. 2013.

MOURA, R. C. et al. Biometria de frutos e sementes de *Butia capitata* (Mart.) Beccari (Arecaceae), em vegetação natural no Norte de Minas Gerais, Brasil. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 10, n. 2, p. 415-419, 2010.

MULLIS, K. et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, New York, v. 51, p. 263-273, 1986. Disponível em: <<http://www.labtrade.com.br/blog/wp-content/uploads/2012/04/mullis86.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2013.

NAMKOONG, G. et al. **Testing criteria and indicators for assessing the sustainability of forest management: genetic criteria and indicators**. Bogor: CIFOR, 1996. 12 p.

NUNES, A. M. et al. Caracterização molecular de butiazeiro por marcadores RAPD. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 702-707, 2008.

OLIVEIRA, D. A. et al. Genetic diversity in populations of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) in the northern region of Minas Gerais, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 1, p. 531-538, 2012. Disponível em: <[http://www.funpecrp.com.br/gmr/year\\_2012/vol11-1/pdf/gmr1611.pdf](http://www.funpecrp.com.br/gmr/year_2012/vol11-1/pdf/gmr1611.pdf)>. Acesso em: 19 out. 2013.

PHALAN, B. et al. Crop expansion and conservation priorities in tropical countries. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 1, p. 2013. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0051759>>. Acesso em: 25 set. 2013.

RAFALSKI, J. A. et al. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B. **Nonmammalian genomic analysis: a practical guide**. New York: Academic, 1996. p. 35-174.

RAJESH, M. H. et al. Genetic survey of 10 Indian coconut landraces by simple sequence repeats (SSRs). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 118, p. 282-287, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423808002379>>. Acesso em: 25 set. 2013.



RIVAL, A. et al. Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) tissue cultures and seed-derived plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, p. 884–887, 1997. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s002990050339#page-1>>. Acesso em: 25 set. 2013.

ROSSATO, M. et al. Caracterização molecular de populações de palmeiras do gênero *Butia* do rio grande do sul através de marcadores ISSR. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, n. 4, p. 311-318, 2007.

SANO, E. E. et al. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, Dordrecht, v. 166, p. 113-124, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s10661-009-0988-4#page-1>>. Acesso em: 25 set. 2013.

SANTOS, B. G.; SANTA ROSA, H. Cooperativa Grande Sertão: articulando populações e diversidades do Norte de Minas Gerais. **Revista Agriculturas**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 2, 2005. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/3442>>. Acesso em: 25 set. 2013.

SAWAZAKI, H. E. et al. Diversidade genética em palmeiras através de isoenzimas e RAPD. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 58, n. 4, p. 681-691, 1998. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/rbbio/v58n4/v58n4a15.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2013.

SEMAGN, K.; BJØRNSTAD, A.; NDJIONDJOP, M. N. An overview of molecular marker methods for plants. **African Journal of Biotechnology**, Bowie, v. 5, n. 25, p. 2540-2568, 2006. Disponível em: <<http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/56080>>. Acesso em: 25 set. 2013.

SREEKUMAR, V. B.; RENUKA, C. Assessment of genetic diversity in *Calamus thwaitesii* BECC. (Arecaceae) using RAPD markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 34, p. 397- 405, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305197806000032>>. Acesso em: 25 set. 2013.

SRISAWAT, T. et al. Flow cytometric analysis of oil palm: a preliminary analysis for cultivars and genomic DNA alteration. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Thailand, v. 27, p. 645-652, 2005. Suppl. 3. Disponível em: <[http://rdo.psu.ac.th/sjstweb/journal/27-Suppl-3/03\\_oil\\_palm.pdf](http://rdo.psu.ac.th/sjstweb/journal/27-Suppl-3/03_oil_palm.pdf)>. Acesso em: 22 ago. 2013.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 17, n. 16, p. 6463-6471, 1989. Disponível em:

<<http://nar.oxfordjournals.org/content/17/16/6463.short>>. Acesso em: 22 ago. 2013.

TORRES, A. M.; TISSERAT, B. Leaf Isozymes as genetic markers in date palms. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 67, p. 162-167, 1980.

Disponível em: <<http://www.jstor.org/discover/10.2307/2442638?uid=3737664&uid=2&uid=4&sid=21103236870493>>. Acesso em: 22 ago. 2013.

UGALDE, J. A.; URPI, M.; ROCHA, N. O. Diversidad genética y relaciones de parentesco de las poblaciones silvestres y cultivadas de pejibaye (*Bactris gasipaes*, Palmae), utilizando marcadores microsatelites. **Revista Biologia Tropical**, San José, v. 56, p.217-245, 2008. Disponível em: <

[http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77442008000100016&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77442008000100016&script=sci_arttext)>. Acesso em: 22 ago. 2013.

UPADHYAY, A. et al. Genetic relationship and diversity in Indian coconut accessions based on RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, p. 353–362, 2004. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423803001031>>. Acesso em: 22 ago. 2013.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 48-55, 2005. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779904003221>>. Acesso em: 22 ago. 2013.

VICENTE, M. C. et al. Genetic characterization and its use in decision making for the conservation of crop germplasm. **The Role of Biotechnology**, Turin, p. 121-128, 2005. Disponível em: <

[http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=tPVz5ZDqUtAC&oi=fnd&pg=PA129&dq=Genetic+characterization+and+its+use+in+decision+making+for+the+conservation+of+crop+germplasm.&ots=OQN7epk5JO&sig=yJIrInTnaPITrVFLOgH\\_Pf7P7fg#v=onepage&q=Genetic%20characterization%20and%20its%20use%20in%20decision%20making%20for%20the%20conservation%20of%20crop%20germplasm.&f=false](http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=tPVz5ZDqUtAC&oi=fnd&pg=PA129&dq=Genetic+characterization+and+its+use+in+decision+making+for+the+conservation+of+crop+germplasm.&ots=OQN7epk5JO&sig=yJIrInTnaPITrVFLOgH_Pf7P7fg#v=onepage&q=Genetic%20characterization%20and%20its%20use%20in%20decision%20making%20for%20the%20conservation%20of%20crop%20germplasm.&f=false)>. Acesso em: 22 ago. 2013.

WOLFE, A. D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; DOYLE, J. J. (Ed.). **Molecular Systematics of Plants II: DNA sequencing**. New York: Kluwer, 1998. p. 43-86.

ZEHDI, S. et al. Genetic diversity of Tunisian date palms (*Phoenix dactylifera* L.) revealed by nuclear microsatellite polymorphism. **Hereditas**, Lund, v. 141, p. 278-287, 2004. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-5223.2004.01855.x/full>>. Acesso em: 22 ago. 2013.

**SEGUNDA PARTE**

**Artigo 1: Diversidade genética de populações de *Butia Capitata* ameaçadas de extinção: implicações para a conservação**

## RESUMO

O bioma Cerrado presente na região central do Brasil possui grande diversidade e endemismo de flora e fauna. *Butia capitata* é uma palmeira nativa desse bioma que possui grande potencial econômico, social e ambiental. Objetivou-se com este trabalho identificar e quantificar a diversidade genética de quatro populações naturais e fragmentadas de *B. capitata* no norte de Minas Gerais, Brasil e uma coleção situada no Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da UFMG utilizando marcadores ISSR. Caracterizou-se a diversidade genética entre 93 genótipos de *B. capitata* por meio de marcadores ISSR utilizando-se 11 iniciadores. A matriz binária utilizada para a obtenção das dissimilaridades genéticas estimadas pelo coeficiente de Jaccard as quais foram representadas em um dendrograma gerado pelo método UPGMA. As populações também foram agrupadas considerando a análise de divergência genética e coordenadas principais por fim foi realizada a inferência bayesiana. Os iniciadores revelaram 141 bandas polimórficas e a diversidade genética variou de 0,392 a 0,82. A análise de agrupamento produziu um dendrograma que permitiu a formação de três grupos para as populações estudadas, o primeiro composto por genótipos de Cristália e ICA, o segundo formado por indivíduos de Bonito de Minas, Abóboras e ICA e o terceiro constituído de genótipos de Mirabela e Cristália. A maior parte da diversidade genética ocorre dentro das populações de *B. capitata*, sendo a menor diversidade observada para a população de Mirabela. A inferência Bayesiana reagrupou as populações originais em quatro populações redistribuindo os indivíduos de ICA para as populações de Abóboras e Cristália.

**Palavras-chave:** *Arecaceae*. Marcadores moleculares ISSR. Análise Bayesiana.

## ABSTRACT

The Cerrado biome in the central region of Brazil has great diversity and endemism of flora and fauna. *Butia capitata* is a palm native to this biome and has great economic, social and environmental potential. The aim of this work was to identify and quantify the genetic diversity of four natural and fragmented populations of *Butia capitata* in Northern Minas Gerais, Brazil and one collection located at the Institute of Agricultural Sciences (ICA) UFMG using ISSR markers. The genetic diversity among 93 genotypes of *Butia capitata* was characterized using 11 ISSR primers. The binary matrix was used to estimate the genetic dissimilarities estimated by Jaccard coefficient which were represented in a dendrogram generated by UPGMA method. Populations were also grouped considering the analysis of genetic divergence and principal coordinates, finally Bayesian inference was performed. The primers revealed 141 polymorphic bands and genetic diversity ranged from 0.392 to 0.82. Cluster analysis produced a dendrogram that allowed the formation of three groups for the populations studied, the first composed of genotypes Cristália, ICA and the second formed by individuals of Bonito de Minas, Abóboras and ICA and the third consisting of genotypes of Mirabela and Cristália. Most genetic diversity occurs within populations of *B. capitata* with the lowest diversity observed for the population of Mirabela. The Bayesian inference regrouped the original populations in four populations redistributing individuals of ICA in the Abóboras and Cristália populations.

**Keywords:** *Arecaceae*. ISSR molecular markers. Bayesian analysis.

## 1 INTRODUÇÃO

O bioma Cerrado é o segundo maior do Brasil, respondendo por 23,9% da área do país, está presente em 11 estados brasileiros (Rada, 2013) e engloba uma área de 204,7 milhões de hectares (SANO et al., 2010). Esse bioma apresenta grande diversidade de habitats e espécies sendo que 40% da flora são endêmicas (KLINK; MACHADO, 2005). Entretanto, devido à produção de grãos no Brasil, que se concentram no Cerrado, extensas áreas de vegetações naturais foram removidas favorecendo a ameaça de extinção de muitas espécies, o que levou esse bioma a ser incluído na lista de *hotspots* (KLINK; MACHADO, 2005). Dentre as espécies ameaçadas de extinção, no Cerrado encontram-se as palmeiras, família *Arecaceae*, as quais apresentam grande importância econômica, ambiental e social sendo importante fonte de alimento, fibras, óleos, combustíveis, medicinais, ornamentais e na confecção de artesanatos (COULY; SIST, 2013; VIEIRA et al., 2012).

Uma das espécies de palmeira nativa ameaçada de extinção é a *Butia capitata* Mart. Becc. conhecida popularmente como coquinho-azedo ou coco cabeçudo. Essa frutífera é fonte de renda para pequenos agricultores e extrativistas, sendo consumida principalmente *in natura* na forma processada de polpas, sucos, doces, licores e picolés (FARIA et al., 2008). Possui grande valor ornamental, podendo ser utilizada em projetos de paisagismos, e apresenta elevada importância ambiental, uma vez que é encontrada margeando rios e serve de alimento para a fauna local.

Os frutos de *B. capitata* são obtidos por meio de populações naturais, uma vez que essa frutífera ainda não foi domesticada e não existem pomares comerciais. Por comumente habitar áreas preferidas para o plantio pelos agricultores, e ser explorada intensivamente por extrativistas que coletam os frutos de maior vigor e de melhor qualidade *B. capitata* encontra-se ameaçada de extinção. É, portanto, necessário elaborar uma estratégia visando à conservação da espécie que contemple a diversidade existente e as necessidades locais. A manutenção da biodiversidade depende da

disponibilidade de ecossistemas funcionais que, por sua vez, requerem diversidade de espécies (SHIMIZU, 2007).

Os marcadores moleculares de DNA são amplamente utilizados na quantificação da diversidade genética de espécies nativas, uma vez que, não são influenciados pelo meio ambiente como ocorre com os marcadores morfológicos, cuja expressão também é alterada por interações epistáticas e pleiotrópicas (KUMAR, 1999). Os marcadores de DNA possuem número ilimitado, são facilmente detectados e a herança é monitorada (KESAWAT; KUMAR, 2009; KUMAR et al., 2009).

Os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) utilizam iniciadores maiores (15-30pb), em comparação com os iniciadores RAPD (10pb), os quais permitem a utilização de temperaturas mais elevadas, além de exibirem a especificidade dos marcadores microssatélites, contudo não necessitam de informações prévias sobre o genoma, são distribuídos aleatoriamente ao longo do DNA e geralmente apresentam alto polimorfismo (KESAWAT; KUMAR, 2009). Alguns estudos de diversidade com o gênero *Butia* no Rio Grande do Sul foram realizados utilizando marcadores ISSR revelando grande variação intrapopulacional entre os genótipos desse gênero além de ter sido eficiente na separação das várias espécies pertencentes ao gênero *Butia* (GAIERO et al., 2011; ROSSATO et al., 2007). Marcadores ISSR também foram utilizados para verificar a diversidade de genótipos de *Phoenix dactylifera* L. Hamza et al. (2012) verificaram um elevado polimorfismo e reprodutibilidade dos resultados. Sendo eficiente na caracterização das populações estudadas e na formação de grupos distintos Srivashtav et al. (2013) observaram que esses marcadores foram ferramentas eficazes para discriminar os vários genótipos dessa palmeira além de atestar a separação das plantas por sexo uma vez que se trata de uma espécie dioica.

Até o momento não foram realizados estudos para compreender a diversidade presente nos materiais selvagens de *B. capitata* no norte de Minas Gerais, os quais apresentam grande diversidade em relação à cor, sabor, aroma e formato dos frutos. Diante do exposto objetivou-se com este



trabalho identificar e quantificar a diversidade genética de quatro populações naturais e fragmentadas de *B. capitata* no norte de Minas Gerais, Brasil e uma coleção situada no Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da UFMG utilizando marcadores ISSR.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Caracterização das populações

As populações de *Butia capitata* estudadas encontram-se situadas na mesorregião do norte de Minas Gerais, Brasil. Foram amostrados 93 indivíduos em fase de produção, distribuídos em cinco populações situadas em quatro municípios: Cristália, Bonito de Minas, Mirabela e Montes Claros. Quatro populações são nativas e exploradas economicamente e uma faz parte do pomar experimental de aproximadamente 8 anos do Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal de Minas Gerais (Figura 1). As áreas ocupadas pelas plantas de *B. capitata* são, em geral, pequenas e os agricultores comumente realizam plantios intercalados removendo constantemente o solo, dificultando a regeneração natural da espécie, além disso, realizam constantemente a formação de pastagens e criação de gado. As plantas foram georreferenciadas utilizando o aparelho GPS Garmim Plus III. As coordenadas geográficas e o número de plantas amostradas encontram-se na (Tabela 1).

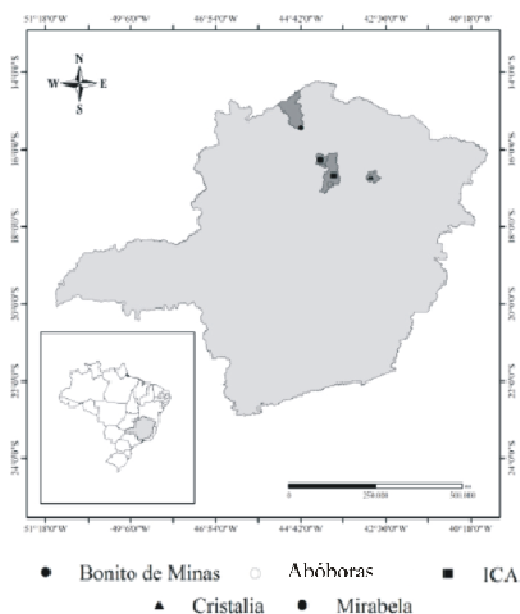


Figura 1 Distribuição geográfica das populações de *Butia capitata* oriundas dos municípios de Bonito de Minas (B), Mirabela (M), Abóboras (A), ICA (I) e Cristália (C) no norte de Minas Gerais

Tabela 1 Coordenadas geográficas de populações de *Butia capitata* e números de plantas amostradas em quatro localidades do norte de Minas Gerais

População	Latitude	Longitude	Amostras
Bonito de Minas (B)	15.434.037	44.691.877	21
Abóboras (A) - Montes Claros	16.915.687	43.937.155	17
ICA (I) - Montes Claros	16.682.370	43.839.108	20
Cristália (C)	16.723.888	42.879.871	21
Mirabela (M)	16.266.282	44.691.977	14

## 2.2 Extração do DNA e amplificação por meio de marcadores ISSR

Para a extração foram coletadas as folhas mais jovens, as quais se encontravam inseridas na bainha foliar, caracterizadas pela coloração amarela. O estudo foi conduzido nos laboratórios de Genética Molecular e Análise de Sementes da Universidade Federal de Lavras. Amostras de folhas foram trituradas em almofariz de porcelana na presença de nitrogênio líquido

(N<sub>2</sub>) e 0,1 g de PVP (polivinilpirrolidona) para evitar oxidação, em seguida foram acondicionadas em tubos de 1,5 ml e armazenadas em *ultrafreezer* a -80°C. A extração do DNA foi realizada conforme metodologia proposta por Ferreira e Grattapaglia (1995). Para quantificar o DNA extraído, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000. Posteriormente, as amostras foram diluídas em 10mM Tris-HCL, 1mM EDTA, pH 8,0 (TE) em uma concentração final de 10 ng/μL.

Após a padronização do DNA, para cada reação de PCR foram utilizados 10 ng de DNA, 100 μM de cada um dos dntps, 1U de taq DNA polimerase, tampão composto de 50 mM de TRIS, pH 8,3, 20mM de KCl, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 10μg de BSA, 0,25% de Ficol 400, 10mM de tartrazine e água pura. O volume final para cada reação foi de 12,0μl.

As amplificações foram realizadas em termociclador modelo *Master Cycler Gradient* 5331. Foram testados 61 iniciadores (*Life Technologies*©) para a avaliação do polimorfismo, sendo selecionados 11 por apresentarem maior número de fragmentos e qualidade das bandas. As suas respectivas sequências e quantidades de bases encontram-se na (Tabela 2). O programa de amplificação consistiu de uma denaturação inicial do DNA a 95 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos que incluem 20 segundos a 94 °C (denaturação), anelamento 20 segundos em temperaturas variáveis conforme o iniciador (Tabela 2), 20 segundos a 72 °C (polimerização), seguido de um ciclo de 4 min a 72 °C e finalmente uma estabilização a 10 °C. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose a 1,5% com eletroforese em tampão TBE 1X contendo gel *red*<sup>™</sup> (*Uniscience*) na quantidade de 10 μL, a uma voltagem de 90V por um período de aproximadamente 2,5h a 4h, conforme o iniciador utilizado. Para efeito de comparação do tamanho dos fragmentos foi utilizado como padrão o DNA *Ladder* 100 bp. Os fragmentos foram visualizados com luz ultravioleta *Fotodyne* e o resultado foi documentado por meio de fotodocumentador EDAS 290 (*Kodak*®).

Tabela 2 Sequências e número de bases de iniciadores ISSR, temperatura de anelamento para reação de PCR utilizadas em estudo de populações de *Butia capitata* oriundas do norte de Minas Gerais

Número do iniciador	Sequência do iniciador ISSR (5' → 3')	Número de bases	Temperatura de anelamento
1	ACACACACACACACT	17	50°C
1a	GACAGACAGACARG	14	48°C
7	GAGCAACAACAACAA	15	55°C
817	CACACACACACACAA	17	55°C
849	GTGTGTGTGTGTGTGYA	18	55°C
851	GTGTGTGTGTGTGTGYG	18	55°C
853	TCTCTCTCTCTCTCRT	18	48°C
855	ACACACACACACACYT	18	50°C
857	ACACACACACACACYG	18	50°C
864	ATGATGATGATGATGATG	18	48°C
876	GATAGATAGACAGACA	16	48°C

### 2.3 Análise estatística dos dados

O perfil eletroforético de cada gel foi transformado em uma matriz binária, sendo a presença do fragmento representada por (1) e ausência representada por (0). Os dados binários foram empregados para estimar todas as análises subsequentes. As estimativas das dissimilaridades genéticas entre cada par de indivíduos foram efetuadas, empregando-se o coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1908). O método *Unweigh Pair Group Method Arithmetic Average* (UPGMA) foi utilizado para o agrupamento dos genótipos de acordo com a similaridade genética usando o *software* XLSTAT (Addinsoft®, versão 2011.2.04). A similaridade genética entre as populações foi calculada pelo índice de identidade de Nei e empregou-se o programa Genalex v. 6.3 (PEAKALL; SMOUSE, 2006). Também foi realizado o agrupamento das populações considerando-se o método de análise de coordenadas principais (ACoP), com o auxílio do *software* XLSTAT (ADDINSOLFT, 2009).

O índice de Shannon (I) (BROWN; WEIR, 1983) e a Heterozigosidade esperada (He) foram calculados como descrito por Lynch e Milligan (1994) e Maguire, Pearkall e Saenger (2002), utilizando Genalex v.6.3 ([www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/](http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/)). O mesmo pacote de *software* foi utilizado para realizar uma Análise de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992).

Para o cálculo das correlações entre as diversidades genéticas e as distâncias geográficas foram utilizadas as matrizes de distância de Nei entre as populações e a matriz de distância geográfica entre as populações. Para essas análises foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman XLSTAT.

Inferências sobre a estrutura genética populacional foi feita utilizando o *software Structure* versão 2.2 (FALUSH; STEPHENS; PRITCHARD, 2007; PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000). Estimou-se número mais provável de *clusters* (K), o número de populações panmíticas reconstruídas (PPR), utilizando-se valores que variam de 1 a 10 e supondo que os genótipos amostrados tinham origem desconhecida. O *burn-in* foi de 20.000 e uma cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) de 20.000 iterações, com cinco repetições. O programa estima que o número mais provável de *clusters* (K) por cálculo da probabilidade log dos dados para cada valor de K. Avaliou-se o melhor valor K pelo método proposto por Evanno, Regnaut e Goudet (2005).

### 3 RESULTADO

Foram selecionados 11 iniciadores e obtidos 141 locos polimórficos, os quais foram utilizados na realização deste estudo. O número de bandas polimórficas variou de 9 a 20 com uma média de 12,81 por iniciador. ISSR 876 e ISSR 853 foram os iniciadores que geraram maior número de fragmentos totalizando 20 para cada. Dentre os iniciadores de ISSR utilizados no presente estudo, aqueles que apresentaram maior potencial para utilização na análise de diversidade genética foram ISSR 876, ISSR 853, ISSR 851, ISSR 1, ISSR 7, pois produziram mais de 15 bandas polimórficas. Por meio do dendograma obtido, a dissimilaridade variou de 0,392 a 0,82 (Fig.2). As populações de *Butia capitata* foram distribuídas em três grandes grupos, sendo o maior deles o grupo dois com 49 genótipos, onde 100% dos indivíduos amostrados em Bonitos de Minas se posicionam nesse grupo juntamente com 100% de Abóboras e 55% do ICA. O grupo dois ainda pode ser dividido em dois subgrupos menores 1 e 2. O subgrupo G1 foi composto na sua totalidade por indivíduos da população de Bonito de Minas (100%) e o subgrupo G2 por plantas das populações de Abóboras e ICA. As menores dissimilaridades observadas no grupo 2 foram entre os genótipos I1 e A17 (0,392); A14 e A10 (0,429); A9 e A7 (0,449) e B13 e B12 (0,458). Sendo as maiores entre I4 e A2 (0,673) e I9 e I10 (0,621) (Fig.2).

O segundo maior grupo foi formado por 23 plantas oriundas das populações de Cristália (71,42%) e ICA (45%), nesse grupo também foram observados dois subgrupos menores 3 e 4. O subgrupo 3 foi composto por indivíduos de Cristália e ICA, e o subgrupo 4 de menor tamanho somente por plantas de ICA. As menores dissimilaridades observadas no grupo 1 foram entre C9 e C10 (0,467) e C8 e C7 (0,474) (Fig.2). O grupo 3 foi o menor grupo com 21 indivíduos onde 33% dos genótipos amostrados na população de Cristália juntamente com 100% de mirabela. Observou-se nesse grupo dois subgrupos menores, sendo o grupo 5 com indivíduos

somente de Cristália e o 6 com 100% de indivíduos de Mirabela e dois genótipos de Cristália. As menores dissimilaridades verificadas para o grupo 3 foram entre os indivíduos M4 e M5 (0,421) e C21 e M2 (0,444) (Fig.2). Por meio do teste de Mantel a correlação obtida entre a distância genética e a distância geográfica foi mediana sendo o valor obtido de 0,472.



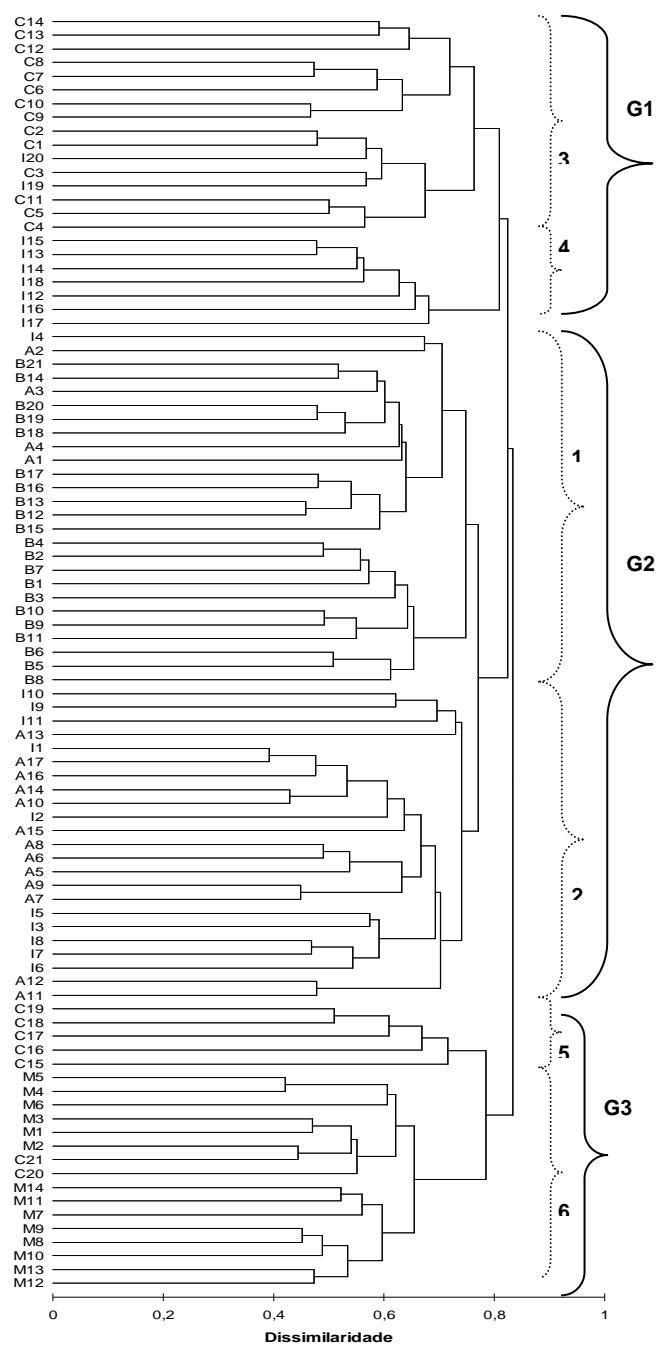


Figura 2 Representação pelo agrupamento UPGMA, dissimilaridade genética pelo coeficiente de Jaccard (1908) de diferentes populações de *Butia capitata* oriundas dos municípios de Bonito de Minas (B), Mirabela (M), Abóboras (A), ICA (I) e Cristália (C) no norte de Minas Gerais

As cinco populações também foram agrupadas para verificar a distância genética entre elas. A população de Mirabela foi a mais distante em relação às outras (Tabela 3). O agrupamento de 2 a 2 permitiu inferir que a maior distância genética foi verificada entre as populações de Mirabela e Abóboras (0,177), seguidas de Bonito de Minas, ICA e Cristália. As menores distâncias foram observadas entre as populações de ICA e Abóboras (0,060) e ICA e Cristália (0,065) (Tabela 3). A diversidade entre populações foi menor quando comparada dentro das populações. Resultado esse também verificado na AMOVA que revelou uma variação de 19% entre populações e 81% dentro das populações (Tabela 4).

Tabela 3 Estimativas de distância genética e geográfica em (Km) de diferentes populações de *Butia capitata* oriundas dos municípios de Bonito de Minas, Mirabela, Abóboras, ICA e Cristália no norte de Minas Gerais

População	Bonito de Minas (B)	Abóboras (A)	ICA (I)	Cristália (C)	Mirabela(M)
<b>Bonito de Minas (B)</b>	-	263,0	218,0	377,0	149,0
<b>Abóboras (A)</b>	0,078	-	45,0	210,0	114,0
<b>ICA (I)</b>	0,082	0,060	-	165,0	69,0
<b>Cristália (C)</b>	0,121	0,094	0,065	-	277,0
<b>Mirabela(M)</b>	0,162	0,177	0,137	0,109	-

O agrupamento por coordenadas principais (PCoA) explicou 92,53% da diversidade existente (Fig.3). As populações de *B. capitata* procedentes de diferentes municípios, formaram 3 grupos distintos. O primeiro somente com a população de Mirabela, o segundo com a população de Bonito de Minas e um terceiro com as populações de Abóboras, ICA e Cristália (Fig.3). Esse agrupamento revelou que as populações mais distantes foram as de Mirabela a Abóboras e Mirabela a Bonito de Minas. As menores distâncias observadas foram entre as populações de Abóboras e ICA.

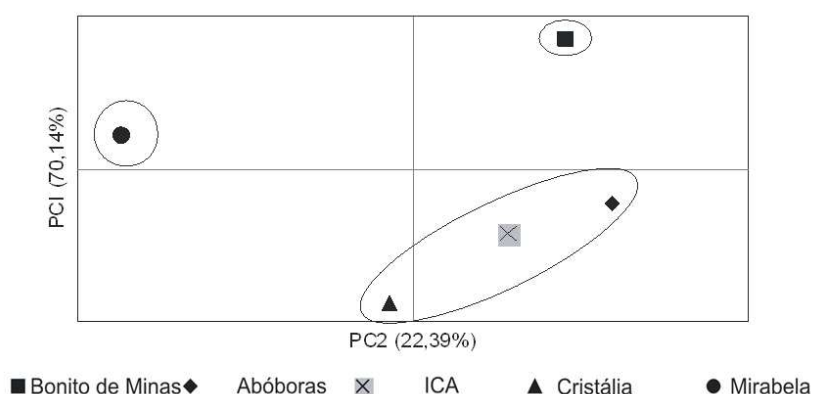


Figura 3 Análise de coordenadas principais (ACoP) para as diferentes populações de *Butia capitata* oriundas dos municípios de Bonito de Minas, Mirabela, Abóboras, ICA e Cristália no Norte de Minas Gerais

Tabela 4 Análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro de diferentes populações de *B. capitata* oriundas dos municípios de Bonito de Minas, Mirabela, Abóboras, ICA e Cristália no norte de Minas Gerais

Fonte de Variação	GL	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre populações	4	505,147	126,287	5,561	19%
Dentro de populações	88	2060,498	23,415	23,415	81%
Total	92	2565,645		28,975	100%

O índice de Shannon (I) é um identificador de diversidade, que varia entre 0 e 1; quanto mais próximo for de 1, mais diversa será a espécie (Perry e McIntosh, 1991). Para essa população de *B. capitata*, o valor variou de 0,374 a 0,432 com média de 0,41. O menor valor observado foi para a população de Mirabela (0,374), a qual também apresentou menor porcentagem de locos polimórficos (67,38%) (Tabela 5). As análises realizadas pelo método UPGMA e ACoP demonstraram que essa população foi a mais divergente comparada com as outras, entretanto, os baixos índices de diversidade apontam para uma menor diferença dentro dela. Os maiores valores do índice de Shannon (I), diversidade genética ( $\hat{H}_e$ ) e porcentagem

de locos polimórficos foram observados para as populações de Cristália e ICA (Tabela 5).

Tabela 5 Índice de Shannon (I), diversidade genética ( $\hat{H}_e$ ) e porcentagem de bandas polimórficas (P%) de diferentes populações de *Butia capitata* oriundas dos municípios de Bonito de Minas, Mirabela, Abóboras, ICA e Cristália no norte de Minas Gerais

População	I	$\hat{H}_e$	P%
Bonito de Minas	0,409	0,275	76,60%
Abóboras	0,414	0,277	78,01%
ICA	0,432	0,287	83,69%
Cristália	0,420	0,276	85,82%
Mirabela	0,374	0,254	67,38%
Média	0,410	0,274	78,30%
Desvio padrão	0,010	0,007	3,22%

A inferência *Bayesiana* foi realizada para determinar a estrutura genética entre os genótipos de *B. capitata*. Essa abordagem de agrupamento atribui indivíduos para as populações panmíticas reconstruídas (PPR) com base no genótipo. O número de populações mais provável (K) foi dado para que fosse calculada a probabilidade de log para cada valor de K, usando a estatística descrita por Evanno, Regnaut e Goudet (2005). O melhor K para representar número de populações panmíticas reconstruídas das populações de *B. capitata* foi K = 4 (PPR1 a PPR4). Os resultados estão em sua grande maioria em concordância com o método UPGMA anteriormente descrito, no entanto, fornece alguns resultados interessantes acerca das populações.

Na PPR 1 foram incluídos 27 indivíduos, sendo 15 da população de Cristália e 12 do ICA. Dos genótipos pertencentes à população de Cristália 14 possuem probabilidade de adesão de mais de 90% para PPR1. Dos 11 genótipos do ICA sete apresentam mais de 90% de adesão à população PPR1 o restante (I10, I11, I12, I13 e I17) também está incluso em outras populações reconstruídas (Fig. 4). Os resultados acima descritos tiveram em sua maioria concordância com a análise obtida pelo método UPGMA (Fig.

2), que agrupou os genótipos de Cristália e parte do ICA em um único grupo (1). A PPR2 foi reconstruída com 21 indivíduos das populações de Abóboras e ICA, sendo 12 genótipos de abóboras e 9 do ICA. Houve mais de 95% de adesão dos acessos de abóboras a PPR2 e do ICA mais de 80%. Os genótipos I3 e I9 apresentam 24,4% de adesão a PPR3 e 7,1% de adesão a PPR4 (Fig. 4). A PPR3 foi composta por todos os genótipos de Bonito de Minas e quatro de abóboras totalizando 24 indivíduos. Em relação aos indivíduos de Abóboras incluídos PPR 3 esses apresentam mais de 85% de adesão a essa população reconstruída (Fig. 4). Por último na PPR4 foram incluídos todos os 14 indivíduos de Mirabela e 6 de Cristália totalizando 20 genótipos, sendo esta a menor população reconstruída comparado-se com as demais. Mais de 95% dos indivíduos estão aderidos à população PPR4 (Fig. 4).

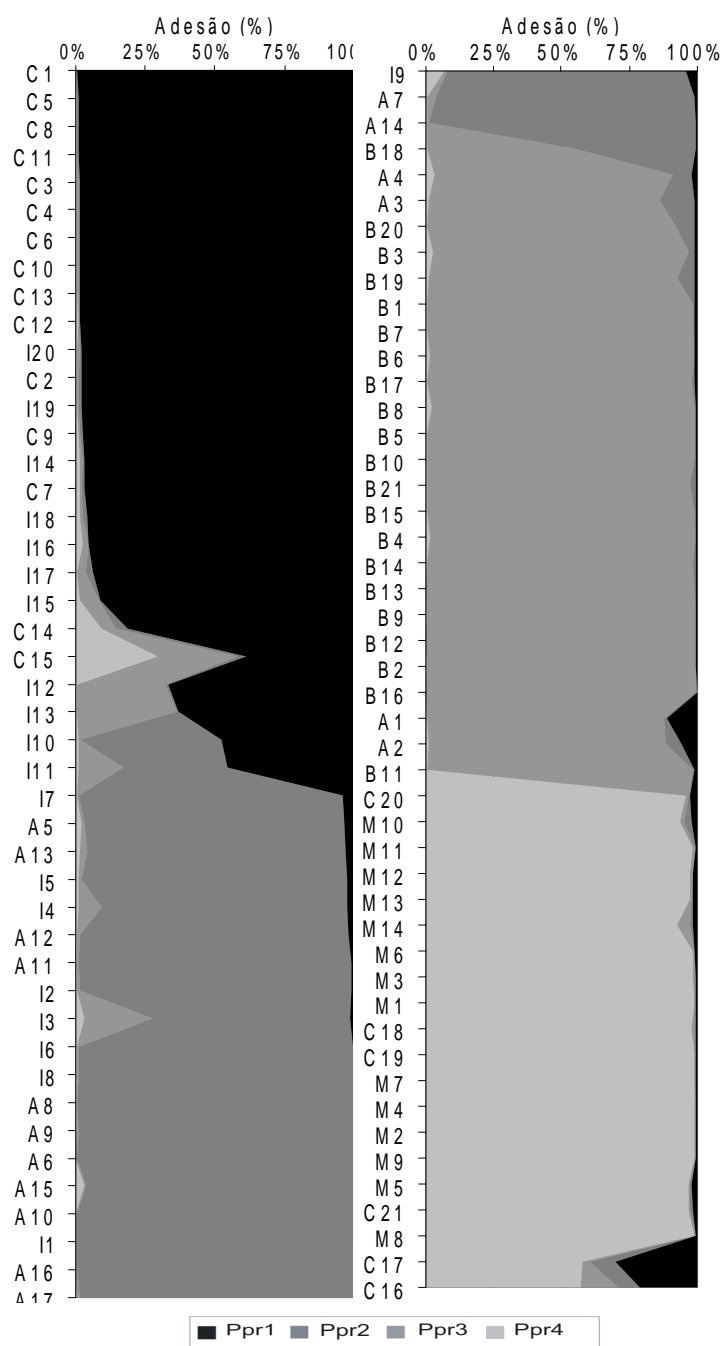


Figura 4 Inferência *Bayesiana* para as populações de *Butia capitata* oriundas dos municípios de Bonito de Minas (B), Mirabela (M), Abóboras (A), ICA (I) e Cristália (C) no Norte de Minas Gerais com  $K=4$

#### 4 DISCUSSÃO

No geral o número de bandas polimórficas encontrado para *B. capitata* manteve-se na média em comparação com outros estudos de diversidade com a família *Arecaceae* sendo em alguns casos superior, conforme relatado para *Oenocarpus mapora* 137 locos obtidos com 15 iniciadores RAPD (MOURA et al., 2012) e *Acrocomia aculeata* 47 bandas utilizando 11 iniciadores RAPD (OLIVEIRA et al., 2012). No estado do Rio Grande do Sul há ocorrência de outras espécies do gênero *Butia* sp. Algumas populações foram caracterizadas quanto à diversidade no estudo de Nunes et al. (2008) com *B. odorata* (Lorenzi et al. 2010), 77 bandas polimórficas foram obtidas com a utilização de 21 iniciadores RAPD. Já Gaiero et. al. (2011) e Rossato et al. (2007) trabalhando com iniciadores ISSR em várias espécies de *Butia* sp. alcançaram 150 e 74 locos polimórficos respectivamente em ambos os trabalhos o iniciador de sequência (AC)<sub>8</sub>T apresentou o maior número de fragmentos polimórficos em um total de 26 e 17 no presente estudo esse iniciador também foi eficiente em gerar fragmentos polimórficos.

A estimativa da diversidade é mais eficiente quando o número de bandas geradas constitui-se em uma amostra do genoma. E no número, evidentemente, depende do tamanho de cada genoma. Em espécies com genoma pequeno como o feijão tem sido estimado um número mínimo de 100 bandas aleatórias (SHROCH et al., 1992). Já em espécies com o genoma grande como o milho um número de 150 bandas é necessário para a diversidade genética.

Em outros trabalhos com palmeiras do gênero *Butia* a diversidade genética variou dependendo da localização e amostragem de genótipos realizada. Nunes et al. (2008) verificaram a presença de 5 grupos formados, sendo três deles compostos por apenas um único indivíduo e outros dois grandes grupos. O primeiro grupo associou dez genótipos com similaridade que varia de 80% a 95%, e o segundo grupo associou nove genótipos com

similaridade que variou de 65% a 85%. Nos trabalhos de Rossato et al. (2007) foram observados dois grupos, um deles formado por populações de *Butia*, outro grupo formado por *Butyagrus nabonnandii* e *Syagrus romanzoffiana*. O grupo de gênero *Butia* foi dividido em dois subgrupos. Um subgrupo (B) formado por *B. capitata*, *B. odorata* e *B. yatay* da localidade de Quaraí, e outro subgrupo (A) formado por *B. yatay* de Giruá e *B. eriospatha*.

No presente trabalho a formação de grupos e subgrupos também ocorreu conforme os genótipos e em função da localidade. As menores dissimilaridades observadas foram entre indivíduos de uma mesma população bem próximos geograficamente entre si, por exemplo, genótipos M8 e M9 (Fig. 2). Esse fato também foi observado para *B. odorata*, onde maior similaridade foi encontrada em um subgrupo formado por genótipos próximos geograficamente (NUNES et al., 2008), também em *Oenocarpus mapora* resultados semelhantes de similaridade elevadas foram encontradas em plantas bem próximas (MOURA; OLIVEIRA, 2012). Como ressaltam Nunes et al. (2008), possivelmente, esse resultado se deve ao fato de que esses genótipos sejam provenientes de uma única planta matriz. Mesmo assim as plantas amostradas ainda são diversas, especialmente quando comparadas com espécies melhoradas, principalmente linhagens de autógamas como feijão e tomate. A correlação da distância genética e a distância geográfica Gaiero et al. (2011) verificaram para populações de *Butia* sp. no Rio Grande do Sul o valor de ( $r=0,652$ ).

Em grande parte dos trabalhos com palmeiras a análise de coordenadas principais realizada demonstrou que genótipos nesse caso a variação total geralmente é baixa (SREEKUMAR; RENUKA, 2006). Upadhyay et al. (2004) observaram em *Cocos nucifera* que os dois primeiros componentes da análise de coordenadas principais contribuíram com 15 e 12,5% de variação. Também Sreekumar e Renuka (2006) verificaram que o primeiro eixo representaram 10,4% da variância total separando os indivíduos em dois grupos. O segundo eixo contribuiu com 8,4% da variação e os indivíduos mantiveram-se dispersos se sobrepondo uns aos outros. Em



estudos com *P. dactylifera* o ordenamento ACoP representou 62, 52% da diversidade total (HAMZA et al., 2012) sendo eficiente em distinguir grupos conforme características fenotípicas de frutos dessa espécie agrupando-os em grupos de frutos macios a mais resistentes e também em relação a sua precocidade de produção (SRIVASHTAV et al., 2013). No presente estudo a análise de coordenadas principais (Fig. 3) reforçou o posicionamento das populações mais próximas e também das mais distantes identificados pelo método UPGMA (Fig. 2). Houve a formação de um grupo com as populações de Abóboras, ICA e Cristália, no dendograma observa-se que os indivíduos de ICA estão distribuídos: uma parte com as populações de Cristália e um maior número agrupado com os indivíduos de Abóboras, fato esse que provavelmente está ligado à origem das plantas dessa população, uma vez que o pomar de *B. capitata* do ICA foi formado a partir de sementes coletadas da população de Abóboras.

A diversidade genética é um pré-requisito para a sobrevivência, a curto e longo prazo de uma espécie, sendo que a importância da preservação e manutenção da diversidade genética é amplamente reconhecida (SHAH et al., 2008). A diversidade existente na população é influenciada por um conjunto de fatores que se interage para definir o grau de divergência atual das espécies nativas. Inúmeros trabalhos de genética de populações têm demonstrado que esses fatores são complexos de ser estudados, necessitando de metodologias especiais em um grande número de informações. Dos fatores reconhecidamente investigados que interferem em uma população encontram-se o fluxo gênico (LENORMAND, 2002), a deriva genética e a fragmentação de habitats (LIENERT, 2004), o isolamento reprodutivo (CHARLESWORTH; CHARLESWORTH, 2000), fatores bióticos e abióticos, topografia do relevo (ESCUADERO; IRIONDO; TORRES, 2003) interferência humana, mutação (LANDE, 1995) e biologia reprodutiva.

Em plantas vasculares, o fluxo gênico ocorre principalmente por meio de dois processos, a dispersão de embriões diploides em sementes e de gametas masculinos haploides no pólen (HOLDEREGGE et al., 2010).

Sendo que Oostermeijer, Luijten e Den Nijs (2003) e Shao et al. (2009) consideram o fluxo gênico o fator mais importante para a estrutura genética de populações de plantas. Já a deriva genética está intimamente ligada à estocasticidade demográfica e significa a alteração das frequências alélicas nas populações ao acaso de uma geração para a seguinte. Assim, a deriva genética tem duas consequências principais, uma em curto prazo, promovendo aumento e fixação da frequência de mutações ligeiramente deletérias e a outra em longo prazo onde é reduzida a capacidade evolutiva das populações para se adaptar às mudanças de ambientes (LIENERT, 2004). No isolamento reprodutivo as plantas são impedidas de se cruzarem por separação espacial, como florestas, rios, relevos, estradas dentre outros (SORK et al., 1999) esses obstáculos podem impedir o fluxo de genes conferindo uma alta resistência, enquanto que campos abertos não têm efeito, pois conferem baixa resistência ao fluxo gênico. A atribuição à resistência depende conhecimentos sobre a região e informações ecológicas dos organismos em estudo (BAGUETTE; VAN DYCK, 2007). A interferência do homem também traz inúmeras consequências sobre ecossistemas, populações e espécies (HOLDEREGGE et al., 2010), resultado muitas vezes na fragmentação e destruição de habitats (LIENERT, 2004).

Verificou-se que grande parte da diversidade genética de *B. capitata* foi distribuída dentro das populações (Tabela 4). Esse resultado está de comum acordo com os trabalhos de Gaiero et al. (2011) que encontraram 94% de diversidade dentro da população de palmeiras do gênero *Butia* e 6% entre as populações. Também nos estudos de Nunes et al. (2010) com *Butia odorata* eles verificaram que a maior parte da variação molecular (83,68%) ocorre dentro das populações. No entanto uma quantidade significativa (13,67%) também foi atribuída à diferença entre populações. Em estudos com palmeiras de outras espécies, resultados similares também foram encontrados com *Calamus thwaitesii* Becc. onde 79,79% da diversidade genética existente ocorreu dentro das populações (SREEKUMAR;

RENUKA, 2006) e *Acrocomia aculeata* onde 82,8% da diversidade ocorreu a nível intrapopulacional e 17,2% entre populações (OLIVEIRA et al., 2012).

Tais resultados podem ser explicados por duas hipóteses: as populações poderiam ter uma origem comum, e foram sofrendo processos de seleção, fatores climáticos, deriva, isolamento geográfico e mutações que ocasionaram as diferenças entre elas, estruturando-as em subpopulações (BUTTOW et al., 2010). Essa hipótese também foi sugerida para *Phoenix dactylifera* L. Hamza et al. (2012) mostraram que os cultivares dessa espécie foram agrupados independentemente da sua origem geográfica e favorece a hipótese proposta por Wrigley (1995) que sugere uma base genética comum entre as cultivares da Tunísia.

A biologia reprodutiva de *B. capitata* também pode ter contribuído para a maior diversidade dentro das populações, uma vez que as flores femininas são encontradas apenas na região basal até a mediana da ráquila, enquanto no ápice da ráquila são encontradas apenas flores masculinas. Também foi observada dicogamia do tipo protandria, a antese das flores masculinas ocorre antes da maturação das flores femininas. A baixa ocorrência de sincronia entre as fenofases masculinas e femininas de uma mesma planta favorece a polinização xenogâmica nessa espécie (MERCADANTE-SIMÕES et al., 2006). A segunda hipótese sugerida por Aguilar et al. (2008) e reforçada por Shao et al. (2009) indica que a alta diversidade genética dentro das populações pode também ser a consequência de um efeito do intervalo do tempo, o que significa que uma vez que essas espécies são de vida longa, os efeitos da fragmentação de habitats podem não ser ainda refletidos em sua diversidade genética atual. Assim, a fragmentação do habitat pode ser relativamente recente em comparação com extensão dessas espécies de vida, talvez envolvendo apenas algumas gerações negativas.

Os resultados da AMOVA estão de comum acordo com a divergência genética entre as populações, evidenciando menor diversidade

entre as populações. Resultados também foram observados por Gaiero et al. (2011) que encontraram baixos valores entre genótipos de *Butia lallemantii*. Para populações de *C. thwaitesii* esse índice teve uma amplitude de 0,1725 a 0,2320 Sreekumar e Renuka (2006). O índice de Shannon foi elevado dentro das populações, sobretudo em Cristália, ICA e Abóboras sendo menor em Mirabela, que também teve menor porcentagem de locos polimórficos. É provável que fatores já mencionados estejam influenciando o fluxo de genes entre as populações, prejudicando as populações de palmeiras situadas na região de Mirabela e beneficiando as plantas na região de Cristália. Já para *C. nucifera* a porcentagem de locos polimórficos variou de 43,2 % a 89,4% (ARAÚJO et al., 2010) e 40,00% a 60,83% para *C. thwaitesii* (SREEKUMAR; RENUKA 2006) respectivamente, em ambos os trabalhos utilizou-se RAPD como marcador.

Os marcadores codominantes como, por exemplo, os SSRs (*Simple Sequence Repeats*) seriam bastante informativos para esclarecer muitas questões, principalmente, em relação à análise de fluxo gênico, entretanto, não existem iniciadores de SSR específicos para *B. capitata*. (KUMAR et al., 2009). A fim de contribuir com o estudo de diversidade dessa espécie outras pesquisas também devem ser contempladas como a dispersão do pólen e os papéis de polinizadores e fatores abióticos, a influência da topografia e da distância entre as populações também exercem grande influência para o fluxo gênico, nesse sentido alguns estudos apontam o uso mais elaborado de ferramentas como autocorrelação espacial (ESCUADERO; IRIONDO; TORRES, 2003; SORK et al., 1999).

Os frutos de *B. capitata* são muito apreciados na região do norte de Minas, sendo esses coletados de forma intensiva por extrativistas, além disso, essa espécie está ameaçada pela rápida ocupação do cerrado por pastagens e áreas para agricultura intensiva. Esse fato apresenta muitas implicações práticas nas áreas de meio ambiente e agricultura dessa frutífera. Os estudos iniciais neste trabalho podem ser utilizados para programas de manejo e conservação da espécie, uma vez que a coleta dos frutos e outras

partes da planta pode ser melhor planejada e reestruturada por comunidades locais, cooperativas e associações que sobrevivem da renda obtida de matéria-prima dessa palmeira. A formação de bancos de germoplasma por instituições também poderá ser auxiliada por meio deste estudo, que poderá servir de norteador para a coleta de genótipos divergentes, o que favorece e resguarda maior diversidade possível e representatividade das populações nativas. Além de auxílio em futuros programas de melhoramento genético da espécie contribuindo para a identificação e seleção de genótipos superiores que podem agregar em características agronômicas desejáveis, como a produção e a qualidade de frutos.

## 5 CONCLUSÃO

A análise da diversidade genética por meio de marcadores ISSR demonstrou que a maior parte da diversidade ocorre dentro das populações de *B. capitata*

As populações agrupadas pelo ordenamento UPGMA separa em três grandes grupos os genótipos de *B. capitata*. Indivíduos de Cristália e ICA no primeiro grupo, genótipos de Bonito de Minas, ICA e Abóboras no segundo e por fim genótipos de Mirabela e Cristália no terceiro. O ordenamento ACoP evidencia a formação também de três grupos, um isolado com a população de Mirabela, outro com a população de Bonito de Minas e outro com as populações de Cristália, ICA e Abóboras .

Na análise por inferência *Bayesiana* as populações originais são reagrupadas em quatro populações. Os dados dessa análise também mostraram a redistribuição dos indivíduos de ICA que foram redistribuídos para as populações de Cristália (PPR1) e Abóboras (PPR2).

## REFERÊNCIAS

- ADDINSOFT. **XLSTAT Statistical analysis software**: versão 2009. Disponível em: <[www.xlstat.com](http://www.xlstat.com)>. Acesso em: 10 set. 2013.
- AGUILAR, R. et al. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, p. 5177-5188, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120995>>. Acesso em: 21 out. 2013
- ARAÚJO, M. C. et al. Genetic variability in the peach palm gene bank with RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 10, p. 211-217, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1984-70332010000300005&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1984-70332010000300005&script=sci_arttext)>. Acesso em: 21 out. 2013.
- BAGUETTE, M.; VAN DYCK, H. Landscape connectivity and animal behaviour: functional grain as a key determinant for dispersal. **Landscape Ecology**, Dordrecht, v. 22, p. 117–1129, 2007. Disponível em: <[www.researchgate.net/publication/229588625\\_Landscape\\_connectivity\\_and\\_animal\\_behavior\\_functi](http://www.researchgate.net/publication/229588625_Landscape_connectivity_and_animal_behavior_functi)>. Acesso em: 20 out. 2013.
- BROWN, A. H. D.; WEIR, B. S. Measuring genetic variability in plant populations. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (Ed.). **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier Science, 1983. p. 73-86. Part A.
- BUTTOW, M. V. et al. Caracterização molecular de populações de *Butia capitata* (Arecaceae) do sul do Brasil através de marcadores AFLP. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p. 230-239, 2010.
- CHARLESWORTH, B.; CHARLESWORTH, D. Reproductive isolation: natural selection at work. *Current Biology*, London, v. 10, n. 2, p. 68-70, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982200002803>>. Acesso em: 19 out. 2013.
- COULY, C.; SIST, P. Use and knowledge of forest plants among the Ribeirinhos, a traditional Amazonian population. *Agroforestry Systems*, Dordrecht, v. 87, p. 543-554, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10457-012-9575-8#page-1>>. Acesso em: 25 set. 2013.

- ESCUADERO, A.; IRIONDO, J. M.; TORRES, M. E. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biological Conservation*, Essex, v. 113, p. 351–365, 2003. Disponível em: <[http://www.escet.urjc.es/biodiversos/publica/BiolCons\\_Spatial\\_analyses.pdf](http://www.escet.urjc.es/biodiversos/publica/BiolCons_Spatial_analyses.pdf)>. Acesso em: 20 out. 2013.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, Oxford, v. 14, p. 2611-2620, 2005.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, Austin, v. 131, p. 479-491, 1992.
- FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, Oxford, v. 7, n. 4, p. 574–578, 2007.
- FARIA, J. P. et al. Caracterização da polpa do coquinho-azedo (*Butia capitata* var *capitata*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 827-829, 2008.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1995. 220 p. (Documento, 20).
- GAIERO, P. et al. Genetic diversity among endangered Uruguayan populations of *Butia* Becc. species based on ISSR. *Plant Systematic Evolution*, Cham, v. 292, p. 105–116, 2011.
- HAMZA, H. et al. Investigation of genetic variation in Tunisian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars using ISSR marker systems and their relation with fruit characteristics. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v. 36, p. 449-458, 2012. Disponível em: <<http://journals.tubitak.gov.tr/biology/issues/biy-12-36-4/biy-36-4-10-1107-12.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2013.
- JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, Lausanne, v. 44, n. 2, p. 223–270, 1908.
- KESAWAT, M. S.; KUMAR, B. Molecular markers: its application in crop improvement. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, Heidelberg, v. 12, n. 4, p. 169-181, 2009. Disponível em:



<<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12892-009-0124-6#page-1>>.  
Acesso em: 25 set. 2013.

KLINK, C.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology*, Boston, v. 19, n. 3, p. 707–713, 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cbi.2005.19.issue-3/issuetoc>>. Acesso em: 25 set. 2013.

KUMAR, L. S. DNA markers in plant improvement: an overview. *Biotechnology Advances*, New York, v. 17, p. 143–182, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14538138>>. Acesso em: 25 set. 2013.

KUMAR, P. et al. Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics Journal*, Lismore, v. 2, n. 2 p. 141-162, 2009. Disponível em: <[https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDQQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fpublication%2F230734092\\_pradep\\_2\\_4\\_2009\\_141\\_162%2Ffile%2F79e41503b0c942829c.pdf&ei=hoxJUuWdI4i69QT\\_i4CIDQ&usg=AFQjCNEtCqQqCy9sAgS4efRzvAP659kgbQ](https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDQQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fpublication%2F230734092_pradep_2_4_2009_141_162%2Ffile%2F79e41503b0c942829c.pdf&ei=hoxJUuWdI4i69QT_i4CIDQ&usg=AFQjCNEtCqQqCy9sAgS4efRzvAP659kgbQ)>. Acesso em: 24 set. 2013.

LANDE, R. Mutation and conservation. *Conservation Biology*, Boston, v. 9, p. 782-791, 1995. Disponível em: <<http://www.jstor.org/discover/10.2307/2386987?uid=363893531&uid=5909624&uid=2&uid=3&uid=67&uid=62&uid=37561&sid=21102850615361>>. Acesso em: 21 out. 2013.

LENORMAND, T. Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology & Evolution*, Amsterdam, v. 17, n. 4, p. 183-189, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169534702024977>>. Acesso em: 21 out. 2013.

LIENERT, J. Habitat fragmentation effects on fitness of plant populations: a review. *Journal for Nature Conservation*, Amsterdam, v. 12, p. 53-72, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1617138104000068>>. Acesso em: 20 out. 2013.

LORENZI, H. et al. *Flora brasileira Lorenzi: Arecaceae (Palmeiras)*. Nova Odessa: Plantarum, 2010. 384 p.

LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, Oxford, v. 3, p. 91-99, 1994.

MAGUIRE, T. L.; PEARKALL, R.; SAENGER, P. Comparative analysis of diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierth. (*Avicenniaceae*) detected by AFLPs and SSRs. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 1004, p. 388-398, 2002.

MERCADANTE-SIMÕES, M. O. et al. Biologia reprodutiva de *Butia capitata* (Mart.) Beccari (*Arecaceae*) em uma área de cerrado no norte de Minas Gerais. *Unimontes Científica*, Montes Claros, v. 8, n. 2, p. 311-316, 2006.

MOURA, E. F.; OLIVEIRA, M. S. P. Genetic diversity in a germplasm bank of *Oenocarpus mapora* (*Arecaceae*). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 4, p. 4008-4018, 2012. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/950687/1/gmr2315.pdf>>. Acesso em: 18 out. 2013.

NUNES, A. M. et al. Caracterização molecular de butiazeiro por marcadores RAPD. *Revista Brasileira Fruticultura*, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p.702-707, 2008.

OLIVEIRA, D. A. et al. Genetic diversity in populations of *Acrocomia aculeata* (*Arecaceae*) in the northern region of Minas Gerais, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 1, p. 531-538, 2012. Disponível em: <[http://www.funpecrp.com.br/gmr/year 2012/vol11-1/pdf/gmr1611.pdf](http://www.funpecrp.com.br/gmr/year%202012/vol11-1/pdf/gmr1611.pdf)>. Acesso em: 19 out. 2013.

OOSTERMEIJER, J. G. B.; LUIJTEN, S. H.; DEN NIJS, J. C. M. Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation. *Biological Conservation*, Essex, v. 113, p. 389-398, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006320703001277>>. Acesso em: 20 out. 2013.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, p. 2537-2539, 2012.

PERRY, M. C.; McINTOSH, M. S. Geographical patterns of variation in the USDA soybean germplasm collection: I. Morphological traits. *Crop Science*, Madison, v. 31, n. 5, p. 1350-1355, 1991. Disponível em: <[http://www.researchgate.net/publication/250115188 \\_Geographical\\_Patterns\\_of\\_Variation\\_in\\_the\\_USDA\\_Soybean\\_Germplasm\\_Collection\\_I\\_Morphological\\_Traits](http://www.researchgate.net/publication/250115188_Geographical_Patterns_of_Variation_in_the_USDA_Soybean_Germplasm_Collection_I_Morphological_Traits)>. Acesso em: 21 out. 2013.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, Austin, v. 155, p. 945–959, 2000.

RADA, N. Assessing Brazil's Cerrado agricultural miracle. *Food Policy*, Guildford, v. 38, p. 146–155, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306919212001169>>. Acesso em: 25 set. 2013.

ROSSATO, M. et al. Caracterização molecular de populações de palmeiras do gênero *Butia* do rio grande do sul através de marcadores ISSR. *Magistra*, Cruz das Almas, v. 19, n. 4, p. 311-318, 2007.

SANO, E. E. et al. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, Dordrecht, v. 166, p. 113-124, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19504057>>. Acesso em: 24 set. 2013.

SHAH, A. et al. Genetic diversity within and among populations of the endangered species *Taxus fuana* (Taxaceae) from Pakistan and implications for its conservation. *Biochemical Systematics and Ecology*, Oxford, v. 36, p. 183-193, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305197807002050>>. Acesso em: 20 out. 2013.

SHAO, J. W. et al. Genetic diversity within and among populations of the endangered and endemic species *Primula merrilliana* in China. *Biochemical Systematics and Ecology*, Oxford, v. 37, p. 699-706, 2009. Disponível em: <[http://www.researchgate.net/publication/229095521\\_Genetic\\_diversity\\_within\\_and\\_among\\_populations\\_of\\_the\\_endangered\\_and\\_endemic\\_species\\_Primula\\_merrilliana\\_in\\_China](http://www.researchgate.net/publication/229095521_Genetic_diversity_within_and_among_populations_of_the_endangered_and_endemic_species_Primula_merrilliana_in_China)>. Acesso em: 23 out. 2013.

SHIMIZU, J. Y. Estratégia complementar para conservação de espécies florestais nativas: resgate e conservação de ecótipos ameaçados. *Pesquisa Florestal Brasileira*, Colombo, n. 54, p. 7-35, 2007. Disponível em: <<http://www.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/125>>. Acesso em: 25 set. 2013.

SORK, V. L. et al. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants, *Trees*, Berlin, v. 14, n. 6 p. 219-224, 1999. Disponível em: <[http://www.cell.com/trends/ecology-evolution/abstract/S0169-5347\(98\)01585-7](http://www.cell.com/trends/ecology-evolution/abstract/S0169-5347(98)01585-7)>. Acesso em: 23 out. 2013.

SREEKUMAR, V. B.; RENUKA, C. Assessment of genetic diversity in *Calamus thwaitesii* BECC. (Arecaceae) using RAPD markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, Oxford, v. 34, p. 397-405, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305197806000032>>. Acesso em: 20 out. 2013.

SRIVASHTAV, V. S. et al. Genetic diversity analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in the Kutch region of India using RAPD and ISSR markers. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, Al-Maqam, v. 25, n. 11, p. 907-915, 2013.

UPADHYAY, A. et al. Genetic relationship and diversity in Indian coconut accessions based on RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 99, p. 353-362, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423803001031>>. Acesso em: 20 out. 2013.

VIEIRA, S. S. et al. Macauba palm (*Acrocomiaaculeata*) cake from biodiesel processing: An efficient and low cost substrate for the adsorption of dyes. *Chemical Engineering Journal*, Lausanne, v. 183, p. 152–161, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138589471101597X>>. Acesso em: 25 set. 2013.

WRIGLEY, G. Date-palm (*Phoenix dactylifera* L.). In: SMARTT, J.; SIMMONDS, N. W. (Ed). *The evolution of crop plants*. Essex: Longman, 1995. p. 399-403.

**Artigo 2: Composição nutricional de frutos de *Butia capitata* de diferentes plantas coletadas em quatro localidades**

## RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar a composição nutricional de frutos maduros de *B. capitata* de diferentes regiões do norte de Minas Gerais. Frutos maduros de *B. capitata* foram obtidos de grupos de plantas diferentes, coletados em quatro localidades do norte de Minas Gerais e. As análises foram realizadas em triplicata. Os frutos foram analisados quanto ao pH, sólidos solúveis totais (STT), acidez titulável (ATT), razão entre sólidos solúveis e acidez titulável (STT/ATT), açúcares totais, vitamina C, compostos fenólicos, atividade antioxidante, umidade, proteínas, fibra bruta e macro e micronutrientes. Os resultados demonstraram que os frutos de *B. capitata* são muito ácidos com valores de acidez variando de 1,57 a 2,61, já os valores de Brix variaram entre 6,6° a 10,00°. *B. capitata* apresentou baixo teor de açúcares totais, sendo os menores valores obtidos em Cristália nos grupos 4, 5 e 8 (0,65%, 0,75% e 0,78%) respectivamente. O teor de vitamina C também variou conforme localidade e grupos de plantas com maior média no grupo 2 em Cristália, já para Bonito de Minas o maior valor obtido foi no grupo 7 (821,63 mg 100g<sup>-1</sup>) e a atividade antioxidante variou de 17,20% a 58,39%. Os maiores valores obtidos para proteínas e fibra bruta total foram para a população de Cristália G6 (63,98% com base em matéria seca) e Abóboras (167,55% com base em matéria seca). Com relação aos macro e micronutrientes avaliados os valores de potássio e ferro foram encontrados em maiores quantidades em *B. capitata*.

**Palavras-chave:** Palmeira nativa. Análise de alimentos. Vitamina C. Capacidade antioxidante.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the nutritional composition of ripe fruits of *Butia capitata* from different regions of the North of Minas Gerais. Ripe fruits of *Butia capitata* were obtained from different groups of plants collected in four localities in the north of Minas Gerais. Analyses were performed in triplicate. The fruits were analyzed for pH, total soluble solids (STT), titratable acidity (TTA), ratio of soluble solids and titratable acidity (TSS/TA), total sugars, vitamin C, phenolics, antioxidant activity, moisture, protein, crude fiber and macro and micronutrients. The results showed that the fruits of *Butia capitata* are quite acids, acidity values ranging from 1.57 to 2.61, since the Brix values ranged from 10.00° to 6.6°. *Butia capitata* showed a low content of total sugars with the lowest values obtained in Cristália in groups 4, 5 and 8 (0.65%, 0.75% and 0.78%) respectively. The vitamin C content also varied according to locality and plant groups with the highest average in group 2 in Cristália, in Bonito de Minas the highest value was obtained in group 7 (821.63 mg 100g<sup>-1</sup>) and the antioxidant activity ranged from 17.20% to 58.39%. The highest values obtained for the total protein and crude fiber were for the population of Cristália G6 (63.98% based on dry matter) and Abóboras (167.55% based on dry matter). Regarding macro and micronutrient values of potassium and iron were found in greater amounts in *Butia capitata*.

**Keywords:** Native palm. Food analysis. Vitamin C. Antioxidant capacity.

## 1 INTRODUÇÃO

O Cerrado brasileiro abriga uma imensa variedade de espécies nativas (Klink e Machado, 2005), que são utilizadas para diversos fins desde a produção de medicamentos, cosméticos e alimentação. Muitos frutos de plantas desse bioma são utilizados como fonte da dieta alimentar e fazem parte da merenda escolar de crianças, e também são fontes de renda para pequenos agricultores e extrativistas (SILVA et al., 2008). No entanto, para muitas espécies os valores nutricionais de seus frutos ainda não foram determinados havendo, portanto, carência de informações.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) possui uma resolução que estabelece os valores mínimos de ingestão diária recomendada para crianças até idosos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2000). Entende-se a ingestão diária recomendada (IDR) como a quantidade de proteínas, vitaminas e minerais consumidos diariamente para atender às exigências nutricionais de um determinado indivíduo (ANVISA, 2000). Contudo, para que os valores da dieta sejam equilibrados faz-se necessário a caracterização nutricional dos alimentos. Uma vez que, de posse desses conhecimentos, ações como: a formação de planos de dietas, avaliação de estado nutricional, desenvolvimento e enriquecimento de produtos como a biofortificação de alimentos, e também estudos nas relações entre dieta e doença podem ser mais facilmente conduzidos.

*Butia capitata* conhecida popularmente como coquinho-azedo ou coco cabeçudo é uma palmeira nativa do cerrado pertencente à família *Arecaceae* e se distribui nos estados de Goiás, Bahia e Minas Gerais (LORENZI et al., 2010) sendo amplamente consumida na região. Seus frutos constituem-se de uma drupa oval de epicarpo amarelado, vermelho ou arroxeado com mesocarpo carnoso e fibroso de coloração amarelada (MOURA et al., 2010). Esses são utilizados principalmente no consumo *in*



*natura* e na fabricação de polpas, que são comercializadas na região, além disso, são produzidos doces, geleias, licores, sorvetes e picolés (FARIA et al., 2008).

Contudo, essa frutífera foi pouco estudada em relação a sua composição nutricional. Apenas o estudo de Faria et al. (2008) foi realizado nesse âmbito, demonstrando que essa espécie possui grande potencial nutricional apresentando valores elevados de vitamina C maiores que o da laranja e grandes quantidades de potássio. Outras espécies do gênero *Butia* revelaram elevadas quantidades de compostos fenólicos totais e presença de grande quantidade de carotenoides (JACQUES et al., 2009).

As frutas são ricas em vitaminas, antioxidantes, minerais e outros nutrientes que exercem importantes funções no organismo humano, desde precursores da síntese de proteínas como reguladores de funções importantes na célula e entrada e saída de compostos celulares (SLAVIN; LLOYD, 2012). Entretanto, para uma caracterização mais ampla faz-se necessário avaliar a composição nutricional dos frutos de diferentes regiões, uma vez que a produção de vitaminas, proteínas, antioxidantes dentre outros está ligada a fatores ambientais, edáficos e genotípicos (ASENSI-FABADO; MUNNE-BOSCH, 2011). No caso de *B. capitata* esses valores podem variar mais amplamente, pois se trata de uma espécie nativa não domesticada distribuída sob as diferentes condições edafoclimáticas. Esse fato foi observado para diferentes palmeiras de *Phoenix dactylifera* que tiveram seus valores de compostos fenólicos e flavonoides totais alterados em função de diferentes genótipos e regiões (BLIGARI et al., 2008). E também em *Euterpe precatoria* que teve composição centesimal bastante irregular de sucos produzidos por meio de frutas de diferentes localidades (YUYAMA et al., 2011).

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar a composição nutricional de frutos maduros de *B. capitata* de diferentes regiões e grupos de plantas do norte de Minas Gerais.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção dos frutos

Os frutos de *B. capitata* foram coletados no norte de Minas Gerais em dezembro de 2011 em quatro municípios: Montes Claros, Mirabela, Bonito de Minas e Cristália. Em cada região foram amostradas 24 plantas georreferenciadas com auxílio de GPS Garmin *plus* III. As populações apresentavam em média 25 anos, são nativas e exploradas economicamente. Os cachos foram coletados em estágio maduro (epicarpo totalmente amarelado) e ensacados individualmente, sendo acondicionados em caixas de isopor com gelo e transportados ao laboratório. Os frutos foram lavados com água corrente e as polpas foram removidas manualmente com auxílio de uma faca e acondicionadas em recipiente de plástico e armazenadas em *ultrafreezer* -80°C. Essas foram reagrupadas formando-se grupos constituídos por 3 plantas, como ilustrado na Tabela 1. Todas as análises foram feitas em triplicata e foram realizadas no laboratório central de alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Tabela 1 Grupos de plantas de *B. capitata* formados a partir de planas georreferenciadas de quatro localidades no norte de Minas Gerais Abóboras, Mirabela, Bonito de Minas e Cristália

Grupos	Localidades			
	Abóboras	Mirabela	Bonito de Minas	Cristália
G1	291, 314, 303	344, 277, 358	169, 177, 172	337, 338, 194
G2	296, 231, 298	323, 363, 360	156, 180, 161	195, 183, 207
G3	317, 308, 316	263, 361, 244	167, 155, 157	212, 192, 336
G4	309, 319, 301	267, 276, 247	163, 322, 159	341, 208, 191
G5	302, 300, 293	258, 269, 254	173, 151, 152	196, 213, 210
G6	313, 305, 311	364, 270, 257	178, 182, 149	197, 334, 333
G7	295, 315, 294	268, 353, 349	150, 171, 175	343, 203, 188
G8	299, 292, 224	275, 345, 350	172, 321, 323	198, 199, 209

\* cada número representa uma planta amostrada

Os dados referentes à temperatura média anual (°C) e precipitação total (mm) do ano de 2011 encontram-se na Tabela 2. Também foram coletadas amostras de solo de cada uma das localidades estudadas. Três subamostras de solo foram coletadas em diferentes pontos da área em uma profundidade de 0 a 20 cm ao final as subamostras foram misturadas e encaminhadas ao laboratório para a determinação da composição química (Tabela 3), e da fração do solo (Tabela 4).

Tabela 2 Temperatura anual média e precipitação total do ano de 2011, para as quatro localidades com pomares de *Butia capitata* localizadas no norte de Minas Gerais.

Localidade	Temperatura anual média (°C)	Precipitação total (mm)
Cristália	22,10	1.061,10
Abóboras	23,51	1.137,60
Bonito de Minas	24,47	1.179,00
Mirabela	23,51	1.137,60

Fonte: INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (2012)

Tabela 3 Resultados da análise química do solo de diferentes localidades de populações nativas de *Butia capitata*

Localidade	K <sup>+</sup>	P	Na	SB	t	T	pH
	---mg/dm <sup>3</sup> ---			---cmolc/dm <sup>3</sup> ---			
Cristália	78,00	2,91	-	0,90	1,90	4,94	4,3
Abóboras	164,00	20,25	-	4,92	4,92	7,00	5,8
Bonito de Minas	32,00	1,71	-	1,38	1,48	3,46	5,5
Mirabela	54,00	2,30	-	1,94	2,04	4,26	5,6
	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al	V	m	M.O
	---cmol/dm <sup>3</sup> ---			---%---			dag/Kg
Cristália	0,40	0,30	1,00	4,04	18,22	52,63	1,64
Abóboras	4,10	0,40	0,00	2,08	70,29	0,00	2,36
Bonito de Minas	1,10	0,20	0,10	2,08	39,94	6,76	1,29
Mirabela	1,60	0,20	0,10	2,32	45,50	4,90	1,64
	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S	P-Rem
	---mg/dm <sup>3</sup> ---						mg/L
Cristália	0,19	66,64	6,78	0,53	0,17	4,03	33,07
Abóboras	1,44	46,02	15,47	1,04	0,13	6,25	32,08
Bonito de Minas	0,36	21,75	49,97	1,04	0,17	4,38	39,39
Mirabela	0,50	98,98	45,91	1,26	0,10	11,68	34,07

Tabela 4 Fração do solo de diferentes localidades de populações nativas de *Butia capitata*

Localidade	Classificação do solo	Argila	Silte	Areia
		dag/Kg		
Cristália	Textura média	18	1	81
Abóboras	Textura média	33	14	53
Bonito de Minas	Textura arenosa	14	3	83
Mirabela	Textura média	19	11	70

## 2.2 Análises Físicas e químicas

As análises físico-químicas de pH, acidez titulável (ATT) sólidos solúveis (SS) foram realizadas, conforme os métodos analíticos da Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1992).

### 2.3 pH e acidez titulável

O pH das polpas foi determinado utilizando-se pHmetro modelo Schott Handylab, conforme prescrito pela AOAC (2002). A determinação da acidez titulável (ATT) foi realizada por titulação com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N, utilizando-se, como indicador, a fenolftaleína, de acordo com o Instituto Adolfo Lutz (1985). Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido cítrico.

### 2.4 Sólidos solúveis e Razão entre sólidos solúveis totais (STT), acidez titulável (ATT)

Os sólidos solúveis foram determinados por refratometria, utilizando-se o refratômetro digital ATAGO PR-100, previamente calibrado com água destilada. Os resultados foram expressos em °Brix, conforme a técnica da AOAC (2002). Foi calculada a razão entre sólidos solúveis e acidez titulável (STT/ATT).

## **2.5 Determinação da umidade dos nutrientes**

A determinação da umidade e demais nutrientes foi realizada conforme os métodos propostos pela AOAC (2005).

### **2.5.1 Umidade**

Determinada pelo método de secagem em estufa com circulação de ar, as amostras foram submetidas em aquecimento em estufa a 65°C, até peso constante (AOAC, 2005).

### **2.5.2 Fibra Bruta**

A determinação de fibra bruta foi feita por hidrólise ácida, pelo método gravimétrico, segundo o método descrito por Van de Kamer e Van Ginkel (1952).

### **2.5.3 Proteína Bruta**

A proteína bruta foi determinada com base no teor de nitrogênio, obtido por destilação em aparelho de Microkjedahl (semimicro), utilizando-se o fator 6,25 para o cálculo (AOAC, 2005).

### **2.5.4 Análise de minerais**

Para a análise de minerais foram utilizadas amostras de matéria seca e desengorduradas. Cada amostra constou de 5 gramas de polpa que sofreram moagem em moinhos de facas de aço inoxidável, tipo Willey, passando em peneira de 1 mm de malha (20 mesh). A limpeza do moinho entre uma amostra e outra foi conduzida para evitar a contaminação. Os minerais analisados foram: fósforo, potássio, magnésio, cobre e zinco. Os teores de minerais foram determinados conforme Malavolta, Vitti e Oliveira

(1997) sendo o fósforo por colorimetria, potássio por fotometria de chama e magnésio, cobre, ferro, e zinco por espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma indutivamente acoplado – ICP-OES. Os resultados dos macronutrientes foram expressos em porcentagem (%) e os micronutrientes em partes por milhão (ppm).

## **2.6 Açúcares totais**

A determinação dos açúcares totais da mistura de polpas foi realizada utilizando-se o método Antrona segundo (DISCHE, 1962), lido em espectrofotômetro, a 620 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de açúcares totais.

## **2.7 Vitamina C**

A determinação da vitamina C das polpas foi realizada pelo método colorimétrico, utilizando-se 2,4 dinitrofenil-hidrazina, segundo Strohecher e Henning (1967). A leitura foi realizada em espectrofotômetro Beckman 640 B, com sistema computadorizado, e os resultados expressos em mg de ácido ascórbico por  $100\text{g}^{-1}$  de polpa.

## **2.8 Compostos fenólicos totais**

Para a obtenção do extrato foram pesados 2 g das amostras, adicionando-se 20 mL de álcool metílico 50%. Essa mistura foi homogeneizada e deixada em repouso por 1 hora, a temperatura ambiente na ausência de luz. Após esse período, a mistura foi centrifugada, a 14.000 rpm, por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e acondicionado em frascos. No resíduo foram adicionados 20 mL de acetona 70%, que foi homogeneizado e deixado em repouso por 1 hora na ausência de luz sob refrigeração. Em seguida, centrifugou-se, novamente o resíduo a 14.000 rpm, por 15 minutos.

Os sobrenadantes foram transferidos para um balão volumétrico de 50 mL e completado o volume com água destilada.

A determinação do teor de fenólicos totais foi feita pelo método proposto por Kuskoski et al. (2005), empregando-se o reagente de Folin-Ciocalteu, em que 0,5 mL de extrato de cada amostra foram adicionados aos tubos contendo 2,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu 10%. Em seguida, foram adicionados 2 mL de solução de carbonato de sódio 4%. Os tubos foram agitados e deixados em repouso por 2 horas, na ausência de luz. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico  $100^{-1}$  da amostra ( $\text{mg EAG} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ).

## 2.9 Atividade antioxidante

Para a obtenção do extrato, seguiu-se o mesmo procedimento utilizado para a determinação de compostos fenólicos totais.

A metodologia empregada na determinação da atividade antioxidante foi baseada na extinção da absorção do radical 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH 60  $\mu\text{M}$ ), proposta por Rufino et al. (2007). Para a determinação da atividade antioxidante, foi utilizada uma alíquota de 0,1 mL do extrato obtido, que foi transferido para um tubo de ensaio, em ambiente escuro, e adicionado 3,9 mL do radical DPPH (0,06 mM) e homogeneizado em agitador de tubos. As leituras realizadas em (515 nm) em espectrofotômetro Beckman 640 B, com sistema computadorizado foram monitoradas a cada minuto, onde foi observada a redução da absorbância até sua estabilização. Os resultados foram expressos em percentual de sequestro de radical livre (%SRL), conforme a equação:

$$\% \text{SRL} = (\text{Ac} - \text{Am}) \times 100/\text{Ac}$$

em que Ac = absorbância do controle; Am = absorbância da amostra.

### 3 RESULTADO E DISCUSSÃO

O maior valor de pH foi verificado no município de Mirabela (grupo 5). Os grupos 3, 4 e 6 de Mirabela alcançaram os menores valores de pH (Tabela 5).

Já para o Brix o maior valor foi observado para Mirabela grupo 3 (11,6° Brix). No entanto, em Bonito de Minas os maiores valores de Brix foram verificados no grupo 1, 4 e 8. Já o menor valor de Brix foi encontrado em Bonito de Minas - grupo 5 (Tabela 5). Quanto à Ratio, o maior valor obtido também foi encontrado em Bonito de Minas grupo 2, 3 e 5. Sendo que os menores valores foram obtidos para os municípios de Abóboras grupo 2 (2,62) e Cristália (2,77) (Tabela 5).

Os valores de acidez encontrados no presente trabalho estão próximos aos verificados por Magro et al. (2006) que observaram na polpa de *Butia eriospatha* de duas localidades do Paraná e Santa Catarina médias de 2,20% e 1,91%. Os valores de Brix para *B. capitata* também foram, em sua grande maioria, similares aos encontrados por Magro et al. (2006) médias de 6, 4° Brix e 7,7° Brix para os dois estados do Sul do país. Em *B. capitata* apenas alguns grupos de plantas foram superiores em valores como em Cristália e Bonito de Minas grupo 5 e 8 (Tabela 5).



Tabela 5 pH, Brix, acidez titulável e ratio de polpas de *B. capitata* oriundas de diferentes grupos de plantas e populações do norte de Minas Gerais

Localidades	Grupos de plantas							
	pH							
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
Abóboras	3,39	3,36	3,34	3,41	3,46	3,42	3,36	3,52
Mirabela	3,49	3,49	3,10	3,15	4,00	3,15	3,33	3,14
Bonito de Minas	3,67	3,54	3,53	3,48	3,53	3,41	3,37	3,38
Cristália	3,31	3,36	3,36	3,38	3,26	3,22	3,41	3,58
BRIX								
Abóboras	9,0	7,0	6,6	7,6	8,0	8,0	7,0	7,0
Mirabela	7,6	7,0	11,6	7,0	7,6	8,6	9,6	9,6
Bonito de Minas	9,6	8,0	6,6	9,0	6,0	8,6	8,0	10,0
Cristália	8,6	8,6	8,6	7,6	10,0	8,6	8,6	6,6
ACIDEZ TITULÁVEL (%)								
Abóboras	2,54	1,96	2,48	2,21	2,02	2,35	2,22	1,96
Mirabela	2,02	1,96	1,96	2,28	2,15	1,83	1,76	2,09
Bonito de Minas	1,70	1,76	1,50	1,76	1,57	1,70	1,96	1,70
Cristália	2,61	2,61	2,02	2,15	2,28	3,20	2,54	2,35
RATIO								
Abóboras	3,53	3,67	2,62	3,10	3,95	3,43	3,16	3,57
Mirabela	3,70	3,57	6,31	3,15	3,48	4,65	5,45	4,64
Bonito de Minas	6,58	6,29	7,40	6,29	7,02	6,50	5,61	6,48
Cristália	3,25	3,25	4,19	3,47	4,35	2,65	3,33	2,77

O pH da polpa de *B. capitata* se mostrou mais elevado quando comparado com *B. eriospatha* sendo de 2,93 para os frutos coletados no Paraná e 3,06 para os frutos coletados em Santa Catarina (MAGRO et al., 2006). Em outra palmeira do cerrado *Acrocomia aculeata* os valores de pH e acidez da polpa também foram diferentes conforme a localidade de coleta dos frutos. *A. aculeata* é menos ácida quando comparada com *B. capitata*, os resultados obtidos de acidez foram 0,69 e 0,73 de frutos coletados em Presidente Epitácio e Dourados, já os valores de pH foram de 5,7 e 6,9 respectivamente (SANJINEZ-ARGANDOÑA; CHUBA, 2011). Também em *Euterpe oleracea* e *Euterpe edulis* os valores de acidez foram menores quando comparados com *B. capitata* sendo de 0,19 para ambas as espécies, já o pH foi de 4,84 e 5,0 respectivamente. Somente os valores de Brix de *B. capitata* foram maiores que *E. oleraceae* e *E. edulis*, os quais foram 3,03° Brix e 2,7° Brix, respectivamente (RIBEIRO; MENDES; PEREIRA, 2011).

Os ácidos orgânicos presentes em alimentos influenciam o sabor, odor, cor, estabilidade e a manutenção de qualidade, pois são produtos intermediários do metabolismo respiratório dos frutos. Portanto, a acidez é importante para se verificar algumas características como determinação da maturação da fruta e estado de conservação do produto. Em alguns casos os processos de decomposição de um determinado alimento, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera quase sempre a concentração dos íons de hidrogênio, e por consequência sua acidez (OLIVEIRA et al., 1999). A análise comparativa com outros frutos de palmeiras evidencia que *B. capitata* apresenta maior porcentagem de acidez conferindo qualidades apropriadas para o consumo de suco, o qual é a principal fonte de utilização dessa frutífera no norte de Minas. Já o pH influencia em diversos fatores nos frutos, como na atividade de enzimas, retenção do sabor e odor da polpa de frutas, deterioração do alimento com crescimento de microrganismos e estado de maturação das frutas (OLIVEIRA et al., 1999). Por sua vez os sólidos solúveis, medidos por refratometria, são usados como índice dos açúcares totais em frutos, indicando o grau de maturidade. São constituídos por compostos solúveis em água, que representam substâncias, tais como açúcares, ácidos, vitamina C e algumas pectinas (OLIVEIRA et al., 1999).

Os maiores valores verificados para açúcares totais foram para Mirabela grupo 2 e 3 (3,35% e 3,22%) respectivamente (Tabela 6). Em Bonito de Minas o maior valor foi observado no grupo 1. As menores porcentagens de açúcar foram observadas para a população de Cristália grupo 3, 4, 5 e 8 (Tabela 6).

Os valores de açúcares totais obtidos com as polpas de *B. capitata* foram até 7 vezes menores quando aos encontrados em *A. aculeata* coletadas em Presidente Epitácio (11, 58%) e Dourados (14,53%) (SANJINEZ-ARGANDOÑA; CHUBA, 2011). Em frutos como a banana os valores de açúcares totais variaram de 19,3% a 24,4% conforme genótipo (CERQUEIRA de JESUS et al., 2004). Em genótipos de cajazeira (*Spondias mombin*) os valores variaram de 6,28% a 11,58% (PINTO et al., 2003).

O teor de vitamina C foi maior em Cristália no grupo 2 e o menor também nessa localidade no grupo 1 (Tabela 6). Já em Abóboras médias superiores foram encontradas no grupo 5 e 7, já para Mirabela grupo 7. Os grupos 6 e 7 obtiveram as menores quantidades desse nutriente 32,40 mg 100g<sup>-1</sup> e 38,03 mg 100g<sup>-1</sup> respectivamente. No entanto, em Bonito de Minas não foi observada diferença estatística entre os grupos de planta para o teor de vitamina C (Tabela 6).

Tabela 6 Açúcares totais, teor de vitamina C, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de polpas de *Butia capitata* oriundas de diferentes grupos de plantas e populações do norte de Minas Gerais

Populações*	Grupos de plantas							
	Açúcares Totais (%)							
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
AB	2,30	2,03	0,93	1,46	1,92	0,61	1,13	1,60
MI	2,11	3,22	3,35	2,22	1,29	1,94	1,69	2,68
BM	2,84	1,86	1,47	1,60	1,68	1,77	1,56	1,72
CR	1,28	1,51	0,88	0,65	0,78	1,03	1,06	0,75
	Vitamina C (mg 100g <sup>-1</sup> )							
AB	61,80	66,68	74,77	76,12	87,93	64,95	83,24	67,03
MI	62,74	82,85	55,43	59,42	54,53	38,03	32,40	57,95
BM	71,91	62,48	62,62	63,97	52,23	70,36	64,11	62,75
CR	30,00	92,43	83,06	86,85	82,41	59,19	85,03	85,13
	Compostos Fenólicos Totais (mg EAG.100g <sup>-1</sup> )							
AB	716,89	545,12	607,71	528,14	528,33	583,01	520,52	413,76
MI	578,51	534,23	615,19	776,13	717,45	767,16	821,63	642,86
BM	368,14	337,26	649,46	573,01	729,21	392,18	536,84	536,84
CR	571,11	401,43	360,42	735,91	369,44	531,63	420,68	649,23
	Atividade Antioxidante (%)							
AB	35,99	40,15	35,68	33,46	40,72	27,77	28,74	33,77
MI	39,30	28,92	21,31	17,20	44,79	44,79	38,21	27,49
BM	26,21	24,96	19,57	23,08	38,95	39,86	23,72	18,64
CR	37,33	32,46	47,71	30,97	35,18	31,14	58,39	43,73

\*AB: Abóboras; MI: Mirabela; BM: Bonito de Minas; CR: Cristália

Os teores de vitamina C em *B. capitata* variaram de 38 a 73 mg (100g<sup>-1</sup>) nos estudos de (FARIA et al., 2008). Já em *B. eriospatha* os teores desse nutriente também variaram conforme localidade 70,44 mg (100g<sup>-1</sup>) para amostras do Paraná e 17,61 mg (100g<sup>-1</sup>) para amostras de Santa Catarina (MAGRO et al., 2006). Em *A. aculeata* Sanjinez-Argandoña e Chuba (2011) verificaram para frutos coletados em Presidente Epitácio média de 11,46 mg (100g<sup>-1</sup>) e para Dourados 34,67 mg (100g<sup>-1</sup>) de ácido ascórbico. Os dados obtidos dessa vitamina encontram-se bem acima dos valores encontrados em outras palmeiras e em frutas como laranja pera de 62,50 mg (100g<sup>-1</sup>) e tangerina *ponkã* 32,47 mg (100g<sup>-1</sup>) portanto, demonstrou a capacidade de *B. capitata* como fornecedora dessa vitamina em quantidades ideais ao organismo humano. A Academia Nacional de Ciências tem recomendado 90 mg por dia da vitamina para homens adultos e 75 mg por dia para mulheres adultas (GALLIE et al., 2010). A vitamina C em plantas é essencial para o metabolismo do vegetal, devido ao seu papel antioxidante e de cofator enzimático (ASENSI-FABADO; MUNNE-BOSCH, 2011), no ser humano as funções bioquímicas da vitamina C incluem: estimulação de certas enzimas, biossíntese de colágeno, ativação hormonal, antioxidante, desintoxicação de histamina, funções fagocíticas de leucócitos, e formação de nitrosaminas, entre outros (WALINGO, 2005).

Com relação aos compostos fenólicos totais o maior valor observado foi encontrado em Mirabela grupo 7 (Tabela 6). Para Cristália a maior média foi obtida nos grupos 4 e 8 seguido do grupo 1. Os menores resultados para o compostos fenólicos totais foram obtidos em Cristália e Bonito de Minas ambos do grupo 3 (Tabela 6).

Os valores de compostos fenólicos totais presentes na polpa de *B. capitata* foram superiores aos verificados em muitas outras espécies de palmeiras e plantas. Biglari, Alkarkhi e Easa (2008) relataram quantidades de 2,89 a 6,64 mg (100g<sup>-1</sup>) de compostos fenólicos totais para diferentes genótipos de *Phoenix dactylifera*, já em *Butia odorata* Jacques et al. (2009)

evidenciaram 328, 6 mg (100g<sup>-1</sup>) e em *B. capitata* Faria et al. (2008) relataram uma quantidade de 163 - 250 mg (100g<sup>-1</sup>) de compostos fenólicos totais.

Para a atividade antioxidante a maior média obtida foi em Cristália grupo 7 (58,39%) e Mirabela (44,79%) grupos 5 e 6. O menor valor de atividade antioxidante foi verificada em Mirabela (17, 20%) grupo 4 (Tabela 6).

A atividade antioxidante de *B. capitata* esteve próxima aos valores obtidos em outras palmeiras como em *E. edulis* (41,73%) (LIMA et al., 2012), sendo maior que tangerina *ponkan* (29,30%) e tangerina murcote (12,78%) (COUTO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010).

As quantidades de vitamina C e compostos fenólicos totais presentes nos vegetais são influenciadas, principalmente, por características ambientais como luminosidade e temperatura, fatores genéticos, edáficos, estágio de maturação e de estresse (LEE; KADER, 2000). Caliman et al. (2010) observaram em tomates um decréscimo no quantidade de vitamina C produzida em frutos em ambiente protegido, quando comparados com àqueles a pleno sol. Em tomate-cereja os valores de vitamina C, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante também aumentaram com a elevação da luminosidade e temperatura (RAFFO et al., 2006). Em plantas o antioxidante mais abundante é o ácido ascórbico, pois desempenha papel de destaque, apresentando excelente capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio (ROS). Além de atuar em coordenação com a glutathione e antioxidantes enzimáticos nos cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e no ciclo de ascorbato-glutathione para controlar a quantidade de peróxido de hidrogênio formado no interior da célula. Assim, o ácido ascórbico desempenha um papel importante na sinalização celular e na prevenção de danos oxidativos em macromoléculas (ASENSI-FABADO; MUNNE-BOSCH, 2011).

Os compostos fenólicos apresentam um grupo hidroxila, o qual é ligado a um anel aromático. São de importância fisiológica e morfológica

considerável em plantas que apresentam um papel importante no crescimento e reprodução, proporcionando proteção contra patógenos e predadores, além de contribuir para as características de cor e sensoriais de frutas e vegetais. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é devido à sua capacidade de varrer os radicais livres, doar átomos de hidrogênio ou de elétrons, ou cátions metálicos quelato (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Como *B. capitata* situa-se em uma região de condições ambientais estressantes, como é a região norte de Minas Gerais, que apresenta altas temperaturas, intensa luminosidade e baixa pluviosidade, é provável que esses fatores ambientais estejam influenciando a quantidade de vitamina C e de compostos fenólicos totais nessa frutífera. No entanto, fatores genéticos inerente a cada genótipo também exercem influência sobre esses parâmetros como foi demonstrado nos trabalhos de Caliman et al. (2010) para tomates de diferentes variedades. Os teores de vitamina C foram superiores para a variedade Santa Clara 17,71 mg 100g<sup>-1</sup> em comparação com as variedades BGH-320 e Carmem que tiveram valores em média de 13,00 mg 100g<sup>-1</sup> nas mesmas condições de cultivo. O conteúdo de compostos fenólicos totais também variou para quatro cultivares de trigo de 247,99 a 484,93 (µg/g) (GASZTONY et al., 2011).

Os maiores valores de proteínas foram verificados para a população de Cristália grupos 6 e 1(Tabela 7). Já para Bonito de Minas a única diferença no teor de proteína foi observada no grupo 4, o qual também obteve o menor valor dentre todas as localidades estudadas.

A fibra bruta variou conforme a localidade e grupos de plantas. Os maiores valores foram observados em Abóboras grupo 5 e 8. Já Cristália não houve diferença ente as médias para os grupos. A menor quantidade de fibra bruta foi verificada no grupo 8 de Bonito de Minas e 4 Mirabela (Tabela 7).

Tabela 7 Umidade, proteína e fibra bruta de polpas de *Butia. capitata* oriundas de diferentes grupos de plantas e populações do norte de Minas Gerais

Populações*	Grupos de plantas							
	Umidade (%)							
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
AB	85,92	86,07	86,04	82,24	86,33	84,82	85,91	85,46
MI	83,41	81,74	80,93	83,52	83,28	83,76	84,35	82,57
BM	82,41	81,97	83,64	83,76	83,76	83,66	85,58	80,92
CR	84,94	84,60	83,76	83,52	83,52	84,80	83,86	83,56
Proteína (%) em matéria seca								
AB	54,65	35,55	32,75	28,46	45,48	53,19	49,99	49,04
MI	46,81	40,74	47,92	46,45	51,32	47,27	46,66	42,43
BM	39,00	38,81	46,94	22,04	41,11	37,97	48,38	38,43
CR	58,02	27,41	50,21	47,60	47,64	63,98	45,37	42,60
Fibra bruta (%) em matéria seca								
AB	129,26	127,08	151,04	149,27	167,56	132,38	129,84	141,33
MI	102,14	72,31	78,27	110,98	135,33	107,22	88,63	74,99
BM	97,00	92,38	121,34	74,35	103,70	98,31	105,50	69,77
CR	115,57	106,07	103,28	113,81	110,45	99,19	105,12	131,9

\*AB: Abóboras; MI: Mirabela; BM: Bonito de Minas; CR: Cristália

Os valores de umidade, proteínas e fibras também diferiram conforme espécie de palmeiras, em geral a polpa de *B. capitata* apresenta elevada umidade, fibras e valores medianos de proteínas em comparação com outras espécies de palmeiras. Valores de umidade da polpa de *Mauritia flexuosa* se encontravam em torno de 62,93% (MANHÃES; SABAA-SRUR, 2011), já para *Oenocarpus bataua* 33,5% (DARNET et al., 2011) e 52,99% para *A. aculeata* (RAMOS et al., 2008). Já em *B. eriospatha* a umidade (84,21%) esteve com valor bastante similar em comparação com *B. capitata* (MAGRO et al., 2006).

Com relação à fibra bruta, Jamil et al. (2010) relataram para diferentes genótipos de *P. dactylifera* alterações na quantidade em polpas dessa espécie que variaram desde 62% até 82%. Em *M. flexuosa* as médias foram de 22,8 g.100 g<sup>-1</sup> Darnet et al. (2011). Já os valores de proteína foram de 32,5 a 41% em *P. dactylifera* Jamil et al. (2010) e 10,10% em *Oenocarpus bataua* (DARNET et al., 2011).

A umidade nos frutos pode favorecer a proliferação de microrganismos que podem prejudicar no sabor e odor dos frutos (OLIVEIRA et al., 1999). As polpas de *B. capitata* em geral apresentam valores elevados de umidade em comparação com outras palmeiras, portanto, é interessante que após a colheita os frutos sejam bem acondicionados de maneira que haja maior manutenção da qualidade e características dos mesmos.

A espécie também apresentou boa quantidade de fibras e proteínas. As proteínas desempenham importantes funções no corpo humano e vegetal desde funções estruturais, enzimáticas e reguladoras, portanto devem estar presentes na dieta uma vez que muitas delas não são produzidas no organismo. Para crianças a Agência Nacional de Vigilância Sanitária recomenda a ingestão diária de 34 g, em mulheres gestantes de 71 g e adultos 50 g (ANVISA, 2000).

Já a fibra é definida como componente alimentar não digerível de materiais vegetais, tais como componentes de polissacarídeos de paredes celulares. Esses componentes podem ser divididos em solúveis em água (pectina e hidrocoloides) e insolúveis (celulose, hemicelulose, e lignina) e fibras alimentares (SHI et al., 2013). As fibras solúveis são responsáveis, por exemplo, pelo aumento da viscosidade do conteúdo intestinal e redução do colesterol plasmático. As fibras insolúveis aumentam o volume do bolo fecal, reduzem o tempo de trânsito no intestino grosso, e tornam a eliminação fecal mais fácil e rápida. As fibras alimentares regularizam o funcionamento intestinal, o que as tornam relevantes para o bem-estar das



pessoas saudáveis e para o tratamento dietético de várias patologias (MATOS; MARTINS, 2000).

No presente estudo as quantidades de proteínas e fibras a exemplo da vitamina C e compostos fenólicos também variaram conforme localidade e grupos de plantas e provavelmente fatores como clima, solo, genótipo também influenciam na quantidade desses nutrientes nos frutos de *B. capitata*, esse fato também foi relatado para *B. eriospatha* onde os valores de nutrientes foram variáveis conforme a localidade estudada (MAGRO et al., 2006).

Para os teores de fósforo as maiores médias desse nutriente foram verificadas em Abóboras, (Tabela 8). Os menores valores de fósforo foram verificados na população de Cristália grupos 2, 4, já em Mirabela o menor valor obtido foi no grupo 1 (Tabela 8). Com relação ao potássio esse nutriente foi encontrado em maior quantidade na polpa de *B. capitata*, em comparação ao fósforo as maiores médias de potássio foram verificadas em Abóboras (1,99%) e Cristália grupo 7 (1,67%) e as menores porcentagens de potássio foram obtidas em Abóboras e Mirabela, ambos no grupo 7. Para o magnésio os maiores valores foram constatados no município de Abóboras grupo 1, seguidos de grupos 3 e 4. Em Cristália foi obtido o maior valor de magnésio nos grupos 6 e 7 (Tabela 8).

Tabela 8 Fósforo, potássio e magnésio de polpas de *B. capitata* oriundas de diferentes grupos de plantas e populações do norte de Minas Gerais

Populações	Grupos de plantas							
	Fósforo (%)							
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
Abóboras	0,19	0,19	0,19	0,19	0,18	0,19	0,19	0,19
Mirabela	0,14	0,15	0,14	0,15	0,15	0,16	0,16	0,16
Bonito de Minas	0,15	0,17	0,18	0,18	0,17	0,18	0,18	0,18
Cristália	0,14	0,13	0,16	0,13	0,14	0,17	0,16	0,14
Potássio (%)								
Abóboras	1,22	1,18	1,25	1,50	1,99	1,44	1,07	1,09
Mirabela	1,21	1,32	1,30	1,33	1,35	1,50	1,16	1,34
Bonito de Minas	1,34	1,42	1,20	1,23	1,48	1,34	1,53	1,22
Cristália	1,40	1,58	1,15	1,52	1,39	1,53	1,67	1,19
Magnésio (%)								
Abóboras	0,09	0,07	0,08	0,08	0,06	0,07	0,07	0,07
Mirabela	0,04	0,04	0,06	0,05	0,08	0,05	0,05	0,05
Bonito de Minas	0,06	0,05	0,07	0,05	0,07	0,06	0,06	0,05
Cristália	0,08	0,07	0,09	0,08	0,07	0,10	0,10	0,08

As maiores médias para o cobre foram obtidas nas populações de Abóboras grupo 6 e 5 seguidos de Cristália grupo 4 e 2. Sendo os menores valores encontrados em Bonito de Minas foram nos grupos 5 e 6 (Tabela 9). Em relação ao manganês, em Abóboras grupo 4 e Cristália grupos 6 e 4 foram obtidas as maiores médias desse mineral, as menores quantidades foram verificadas em Mirabela grupos 2 e 1. Para o Zinco a maior média foi obtida nos grupos 7, 6 e 5 (Tabela 9). Dentre os micronutrientes avaliados o ferro esteve presente em maior quantidade na polpa de *B. capitata* a maior quantidade foi verificada na população de Bonito de Minas grupo 5, Abóboras grupo 4 e Mirabela grupo 6, as menores medias foram obtidas em Mirabela e Bonito de Minas grupos 2 e 8, respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9 Cobre, manganês, zinco e ferro de polpas de *B. capitata* oriundas de diferentes grupos de plantas e populações do norte de Minas Gerais

Populações*	Grupos de plantas							
	Cobre (ppm)							
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
AB	5,00	4,40	3,20	4,10	6,70	7,70	3,90	4,50
MI	4,10	4,10	4,60	4,00	4,10	4,10	4,10	4,80
BM	3,10	3,40	3,40	3,60	2,90	2,90	3,90	3,50
CR	5,90	6,20	5,50	6,60	5,00	6,40	5,20	5,10
Manganês (ppm)								
AB	6,27	4,50	8,30	24,1	5,40	10,90	6,00	5,10
MI	3,80	3,50	9,60	8,90	14,10	13,20	9,00	6,50
BM	10,30	9,00	11,70	11,30	31,20	10,70	12,30	8,70
CR	17,10	10,30	15,80	18,20	12,8	22,00	14,40	11,00
Zinco (ppm)								
AB	9,80	9,20	8,60	8,70	9,70	9,70	9,40	9,90
MI	8,00	7,70	8,10	9,10	10,50	8,10	7,80	9,00
BM	8,30	8,00	7,80	7,20	9,50	6,30	8,70	7,60
CR	9,50	10,0	11,70	12,30	12,30	12,8	13,40	9,40
Ferro (ppm)								
AB	50,0	41,0	35,3	585,0	79,0	31,0	37,0	97,0
MI	32,0	26,0	63,0	175,0	267,0	547,0	37,0	71,0
BM	98,0	30,0	43,0	64,0	839,0	38,0	45,0	26,0
CR	57,0	44,0	35,0	33,0	39,0	260,0	34,0	174,0

Com relação à constituição de macro e micronutrientes em geral *B. capitata* apresenta elevada quantidade de potássio e ferro comparada com outras frutíferas. Na banana o teor de potássio varia de 297 a 341 mg (100g<sup>-1</sup>) (RAMOS; LEONEL; MISCHAN, 2009). Também foi averiguado em estudos com polpas em outras palmeiras, em geral que as palmeiras são ricas em fonte de potássio. Em *Euterpe precatória* houve variação na quantidade desse nutriente que conforme planta analisada os valores ficaram entre 77,19

e 125,08 mg ( $100\text{g}^{-1}$ ) (YUYAMA et al., 2011), já em *A. aculeata* os valores de potássio foram de 766 mg ( $100\text{g}^{-1}$ ) contra 36,76 de fósforo mg ( $100\text{g}^{-1}$ ) (RAMOS et al., 2008).

O ferro também está presente em maiores quantidades quando comparado com outros micronutrientes. Em *E. edulis* foram relatados 46,6 mg  $100\text{g}^{-1}$  (RIBEIRO; MENDES; PEREIRA, 2011) já em *A. aculeata* 7,71 mg ( $100\text{g}^{-1}$ ) (RAMOS et al., 2008). No entanto em *E. precatoria* o zinco foi o micronutriente em maior quantidade, variando de 163,43 a 318,32 mg ( $100\text{g}^{-1}$ ) em função de diferentes plantas (YUYAMA et al., 2011).

Os frutos dessa palmeira são amplamente utilizados na alimentação local, além de serem consumidos em escolas e creches da região norte de Minas. A polpa de *B. capitata* apresenta grande potencial nutricional e possui excelente quantidade de vitamina C, compostos fenólicos, capacidade antioxidante e fonte de fibras. Os resultados aqui obtidos poderão servir de informações iniciais para o balanceamento de dietas, para a elaboração de rótulos de produtos e caracterização nutricional, além de também serem utilizados como indicadores para futuros programas de melhoramento, conservação, e formação de bancos de germoplasma.

#### **4 CONCLUSÃO**

Todos os parâmetros avaliados na polpa de *B. capitata* são influenciados pelas localidades e grupos de plantas.

A polpa de *B. capitata* é bastante ácida e apresenta elevado teor de vitamina C, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante, entretanto possui baixa quantidade de açúcares totais.

A polpa de *B. capitata* possui elevado teor de potássio, ferro e umidade e valores medianos de fibras e proteínas.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n. 593, de 22 de dezembro 2000**. Aprova o regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Brasília, 2000. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/consulta/index.htm>>. Acesso em: 26 mar. 2012.

ASENSI-FABADO, M. A.; MUNNÉ-BOSCH, S. Vitamins in plants: occurrence, biosynthesis and antioxidant function. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, n. 10, p. 582-592, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138510001561>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRAL. **Official methods of analysis**. 11th ed. Washington, 1992. 1115 p.

ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRAL. **Official methods of analysis**. 18th ed. Gaithersburg, 2005.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, London, v. 99, p. 191-203, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605006242>>. Acesso em: 26 out. 2013.

BIGLARI, F.; ALKARKHI, A. F. M.; EASA, A. M. Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. **Food Chemistry**, London, v. 7, p. 1636-1641, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814607010552>>. Acesso em: 26 out. 2013.

CALIMAN, F. R. B. et al. Quality of tomatoes grown under a protected environment and field conditions. **Idésia**, Arica, v. 28, n. 2, p. 75-82, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.cl/pdf/idesia/v28n2/art09.pdf>>. Acesso em: 26 out. 2013.

CERQUEIRA DE JESUS, S. et al. Caracterização física e química de frutos de diferentes genótipos de bananeira. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 3, p. 315- 323, 2004. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90863301>>. Acesso em: 26 jun. 2013.

COUTO, M. A. L.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, p. 15-19, 2010. Supl. 1.

DARNET, S. H. et al. Nutritional composition, fatty acid and tocopherol contents of buriti (*Mauritia flexuosa*) and patawa (*Oenocarpus bataua*) fruit pulp from the Amazon region. **Ciência e Tecnologia de Alimento**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 488-491, 2011.

DISCHE, Z. General color reaction, In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. (Ed.). **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic, 1962. p. 477-512.

FARIA, J. P. et al. Caracterização da polpa do coquinho-azedo (*Butia capitata* var *capitata*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 827-829, 2008.

GALLIE, D. R. Increasing vitamin C content in plant foods to improve their nutritional value-successes and challenges. **Nutrients**, Basel, v. 5, p. 3424-3446, 2013. Disponível em: <[www.mdpi.com/journal/nutrients](http://www.mdpi.com/journal/nutrients)>. Acesso em: 26 jun. 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. 3. ed. São Paulo, 1985. 533 p.

INSTITUTO NACIONAL DE MATEREOLOGIA. 2012. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/>>. Acesso em: 10 jun. 2013.

JACQUES, A. C. et al. Compostos bioativos em pequenas frutas cultivadas na região sul do Estado do Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-127, 2009. Disponível em: <<http://bj.ital.sp.gov.br/artigos/html/busca/PDF/v12n2371p.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2013.

JAMIL, M. S. et al. Proximate composition and mineral profile of eight different unstudied date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties from Pakistan. **African Journal of Biotechnology**, Bowie, v. 9, n. 22, p. 3252-3259, 2010. Disponível em: <<http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/80650>>. Acesso em: 15 jun. 2013.

KLINK, C.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Boston, v. 19, n. 3, p. 707-713, 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cbi.2005.19.issue-3/issuetoc>>. Acesso em: 25 set. 2013.

KUSKOSKI, E. M. et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, p. 726-732, 2005. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612005000400016&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612005000400016&script=sci_arttext)>. Acesso em: 25 jun. 2013.

- LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 20, p. 207–220, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521400001332>>. Acesso em: 26 jun. 2013.
- LIMA, C. P. et al. Conteúdo polifenólico e atividade antioxidante dos frutos da palmeira Juçara (*Euterpe edulis* Martius). **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 321-326, 2012.
- LORENZI, H. et al. **Flora Brasileira Lorenzi: Arecaceae (Palmeiras)**. Nova Odessa: Plantarum, 2010. 384 p.
- MAGRO, N. G. et al. Comparação físico-química de frutos congelados DE *Butia eriospatha* (Mart.) Becc. do Paraná e Santa Catarina – Brasil. **Varia Scientia**, Cascavel, v. 6, n. 11, p. 33-42, 2006. Disponível em: <<http://e-revista.unioeste.br/index.php/variascientia/article/view/Article/704>>. Acesso em: 26 jun. 2013.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. **Avaliação do estado nutricional das plantas princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Potafós, 1997. 319 p.
- MANHÃES, L. R. T.; SABAA-SRUR, A. U. O Centesimal composition and bioactive compounds in fruits of buriti collected in Pará. **Ciência Tecnologia Alimento**, Campinas, v. 31, n. 4, p. 856-863, 2011.
- MATOS, L. L.; MARTINS, I. S. Consumo de fibras alimentares em população adulta. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 50-55, 2000. Disponível em: <[www.fsp.usp.br/rsp](http://www.fsp.usp.br/rsp)>. Acesso em: 26 jun. 2013.
- MOURA, R. C. et al. Biometria de frutos e sementes de *Butia capitata* (Mart.) Beccari (Arecaceae), em vegetação natural no Norte de Minas Gerais, Brasil. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 10, n. 2, p. 415-420, 2010. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v10n2/en/abstract?shortcommunication+bn02710022010>>. Acesso em: 26 jun. 2013.
- OLIVEIRA, M. E. B. et al. Avaliação de parâmetros de qualidade físico-químicos de polpas congeladas de acerola, cajá e caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 326-332, 1999. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20611999000300006&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20611999000300006&script=sci_abstract&tlng=pt)>. Acesso em: 26 set. 2013.



PINTO, W. et al. Caracterização física, físico-química e química de frutos de genótipos de cajazeiras. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1059-1066, 2003.

RAFFO, A. et al. Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1). Journal of Food Composition and Analysis, San Diego, v. 19, p. 11–19, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157505000323>>. Acesso em: 16 set. 2013.

RAMOS, D. P.; LEONEL, S.; MISCHAN, M. M. Caracterização físico-química dos frutos de genótipos de bananeira produzidos em Botucatu-sp. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 33, p. 1765 -1770, 2009. Edição Especial.

RAMOS, M. I. L. et al. Qualidade nutricional da polpa de bocaiúva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 28, p. 90-94, 2008. Supl.

RIBEIRO, L. O.; MENDES, M. F.; PEREIRA, C. S. S. Avaliação da composição centesimal, mineral e teor de antocianinas da polpa de juçará (*Euterpe edulis* Martius). Revista Eletrônica Teccen, Vassouras, v. 4, n. 2, p. 5-16, 2011.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Brasília: Embrapa, 2007. Comunicado técnico.

SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J.; CHUBA, C. A. M.; Caracterização biométrica, física e química de frutos da palmeira bocaiuva *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 3, p. 1023-1028, 2011.

SHI, L. et al. Date Pits: chemical composition, nutritional and medicinal values, 2 utilization. Crop Science, Madison, v. 20, 2013. Disponível em: <[http://scholar.google.com.br/scholar?q=Date+Pits:+Chemical+Composition,+Nutritional+and+Medicinal+values,+2+Utilization&hl=pt-BR&as\\_sdt=0&as\\_vis=1&oi=scholart&sa=X&ei=hY6xUtbYB6bSsATx8YHICw&ved=0CCoQgQMwAA](http://scholar.google.com.br/scholar?q=Date+Pits:+Chemical+Composition,+Nutritional+and+Medicinal+values,+2+Utilization&hl=pt-BR&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholart&sa=X&ei=hY6xUtbYB6bSsATx8YHICw&ved=0CCoQgQMwAA)>. Acesso em: 10 jun. 2013.

SILVA, M. R. et al. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. Ciência Rural, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1790-1793, 2008.

SLAVIN, J. L.; LLOYD, B. Health benefits of fruits and vegetables. Advances in Nutrition, Bethesda, v. 3, p. 506–516, 2012. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157505000323>>. Acesso em: 26 jun. 2013.

VAN DE KAMER, J. H.; VAN GINKEL, L. Rapid determination of crude fiber in cereals. *Cereal Chemistry*, Saint Paul, v. 29, n. 4, p. 239-251, July 1952.

WALINGO, M. K. Role of vitamin C (Ascorbic Acid) on human health: a review. ***African Journal of Food Agriculture and Nutritional Development***, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2005. Disponível em: <<http://e-revista.unioeste.br/index.php/variascientia/article/viewArticle/704>>. Acesso em: 26 jun. 2013.

YUYAMA, L. K. O. et al. Caracterização físico-química do suco de açaí de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. ***Acta Amazônica***, Manaus, v. 41, n. 4, p. 545-552, 2011.

**Artigo 3: Conteúdo de DNA de estruturas de germinação *in vitro* de embriões de *Butia capitata***

## RESUMO

Objetivou-se com este trabalho determinar o conteúdo de DNA e avaliar a qualidade das análises de citometria de fluxo em *Butia capitata* de diferentes estruturas originadas a partir de várias fases da germinação *in vitro* de embriões zigóticos, bem como caracterizar morfológica e anatomicamente o material estudado. O experimento foi realizado com 16 tratamentos, sendo embrião, pecíolo cotiledonar avaliados aos 8, 16 e 27 dias, haustório aos 8, 16 e 27 dias, radícula aos 16, 27 e 37 dias, e bainha aos 16, 27, e 37 dias, folha aos 37 dias e folha da planta adulta foi utilizada como testemunha. O conteúdo de DNA variou conforme a estrutura analisada. Verificou-se que aos 27 dias de cultivo *in vitro* o pecíolo cotiledonar, bainha e radícula apresentaram o menor coeficiente de variação e as mesmas quantidades de DNA, já no haustório e pecíolo cotiledonar aos 8 dias foram obtidos valores mais altos de DNA e também no coeficiente de variação, indicando menos confiabilidade nas análises para essas estruturas. Por meio de cortes anatômicos foi observado em ambas as estruturas aos 8 dias grandes quantidades de idioblastos contendo compostos fenólicos, que provavelmente poderiam ter interferido nas análises.

**Palavras-chave:** Micropropagação. Tamanho do genoma. Conteúdo de DNA. Metabólitos secundários.

### ABSTRACT

The aim of this research was to determine the DNA content and evaluate the quality of the analysis of flow cytometry in *Butia capitata* of different structures originated from multiple stages of in vitro germination of zygotic embryos and characterize morphologically and anatomically the material studied. The experiment was conducted with 16 treatments, cotyledon petiole evaluated at 8, 16 and 27 days, haustorium at 8, 16 and 27 days, primary root at 16, 27 and 37 days, the sheath 16, 27, and 37 days, leaves at 37 days and leaves of the adult plant. The DNA content varied according to the structure analyzed. It was found that after 27 days of culture in vitro the cotyledonal petiole, sheath and radicle showed the lowest coefficient of variation and the same amounts of DNA, as in haustorium and cotyledon petiole to 8 days higher amounts of DNA were obtained and also the coefficient of variation indicating less reliability in the analysis for these structures. Through anatomical sections was observed in both structures to eight days idioblasts containing large amounts of phenolic compounds, which probably could have interfered with the analysis.

**Keywords:** Micropropagation. Genome size, DNA content. Secondary metabolites

## 1 INTRODUÇÃO

O coquinho-azedo (*Butia capitata* Mart. Becc.) é uma palmeira nativa do bioma Cerrado e possui diversos usos no norte de Minas Gerais (LORENZI et al., 2010). Pode ser consumida *in natura*, no preparo de sucos, sorvetes e picolés e também na forma de polpa, que é amplamente procurada e valorizada na região (FARIA et al., 2008). Essa espécie é geralmente encontrada em áreas próximas a leitos de rios e solos mais férteis. Devido a essas áreas serem preferidas para o plantio e a coleta intensiva dos seus frutos e a expansão das fronteiras agrícolas, essa palmeira está sendo ameaçada de extinção.

A perda de diversidade de espécies nativas é um entrave na conservação da biodiversidade e manutenção de plantas a serem domesticadas (JAMNADASS; LOWE; DAWSON, 2013). Portanto, estudos que contemplem a caracterização e descrição de tais espécies são necessários para servirem de base para outras áreas. Nesse contexto, a biotecnologia aparece como uma ciência promissora para trabalhos com espécies nativas e principalmente para *B. capitata*.

A citometria de fluxo é uma tecnologia comumente utilizada nas pesquisas com cultura de tecidos, isso porque por meio dessa ferramenta é possível verificar o conteúdo de DNA, ciclo celular, análises de ploidia, detecção de plantas haploides e de linhas di-haploides, detecção de híbridos interespecíficos, controle da estabilidade do nível de ploidia, verificação de aneuploidia e taxonomia (DOLEZEL; GREILHUBER, 2010; OCHATT, 2008). Esta última importante para *B. capitata*, uma vez que há dificuldade de caracterizar espécies incluídas no gênero *Butia* por marcadores morfológicos (LORENZI et al., 2010). Essa tecnologia também fornece suporte em experimentos envolvendo embriogênese somática, duplicação cromossômica, variação somaclonal, influência de fitorreguladores.

Dentre os fatores que podem influenciar na análise de citometria de fluxo encontram-se o tipo de material vegetal utilizado, os tampões de

extração e os fluorocromos. Os dois últimos são mais bem explorados na elaboração de protocolos. Contudo, o tipo de material vegetal utilizado nas análises precisa ser melhor estudado, padronizado e caracterizado, isso porque a composição química do tecido a ser analisado pode interferir nos parâmetros, mascarando os resultados na citometria de fluxo. Fato esse relatado por Bennett, Price e Johnston (2008) que levantaram a hipótese de que metabólitos secundários, como as antocianinas poderiam inibir a coloração do DNA propiciando uma estimativa errônea do conteúdo de DNA. Loureiro et al. (2006) afirmam que os taninos, assim como muitos outros compostos, também possuem essa característica. Portanto, os estudos deveriam ser mais criteriosos em definir materiais adequados garantindo resultados fidedignos.

Com o objetivo de verificar a influência de compostos fenólicos na leitura de DNA, Thiem e Śliwińska (2003) avaliaram diferentes tipos de tecidos de *Rubus chamaemorus* não encontrando diferenças entre os materiais. Já em *Elaeis guineensis* plântulas aclimatadas a partir do cultivo *in vitro* apresentaram 3.701 pg de DNA, enquanto que calos friáveis apresentaram 3.2012 pg de DNA (RIVAL et al., 1997).

Galbraith et al. (1983) propuseram o uso de folhas como tecido analisado para o estabelecimento do conteúdo de DNA. No entanto, a utilização de outras partes da planta devem ser avaliadas em relação ao conteúdo de DNA para evitar alterações nos resultados, que podem ser causados por substâncias presentes na folha.

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho determinar o conteúdo de DNA e avaliar a qualidade das análises de citometria de fluxo em *Butia capitata* de diferentes estruturas originadas a partir de várias fases da germinação *in vitro* de embriões zigóticos, bem como caracterizar morfológica e anatomicamente o material estudado.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras. O material utilizado foi obtido na cidade de Montes Claros região norte de Minas Gerais. Foram selecionados frutos maduros de epicarpo totalmente amarelo, oriundos de cachos da mesma planta. As amostras foram selecionadas retirando-se quantidade semelhante de frutos de cada cacho, que em seguida foram despulpados manualmente com o auxílio de uma faca obtendo-se os pirênios (endocarpo + semente). Logo após, esses foram lavados em água destilada e secos a sombra em ambiente de laboratório temperatura e umidade não controlada. Em todos os pirênios retirou-se o endocarpo com uma turquesa, extraindo-se a semente.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 16 tratamentos e cinco repetições totalizando 80 parcelas, sendo embrião, pecíolo cotiledonar avaliados aos 8, 16, 27 e 37 dias, haustório aos 8, 16 e 27 dias, radícula aos 16, 27 e 37 dias, e bainha aos 16, 27, e 37 dias, folha aos 37 dias e folha da planta adulta foi utilizada como testemunha. A escolha dessas datas de coleta foram baseadas no estudo proposto por Magalhães et al. (2003). A folha extraída da planta adulta foi a “flecha”, ou seja, a mais nova ainda inserida na bainha foliar de coloração amarelada.

### 2.1 Cultivo *in vitro*

As sementes foram desinfestadas, em solução comercial de hipoclorito de sódio sem diluição, por 20 minutos, sendo, em seguida, lavados por três vezes em água destilada e autoclavada. Em câmara de fluxo laminar, os embriões foram excisados e colocados em água destilada e em seguida transferidos para solução comercial de hipoclorito de sódio 2,5%, por 10 minutos e lavados por três vezes em água destilada, na qual os



mesmos permaneceram de uma a duas horas até a completa transferência para o meio de cultura.

Foram inoculados 200 embriões em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS a 75% de concentração de sais (MURASHIGE; SKOOG, 1962; RIBEIRO et al., 2010), suplementados com 6g. L<sup>-1</sup> de ágar, 3 g. L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 30 g. L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,5mg. L<sup>-1</sup> de tiamina, 1mg. L<sup>-1</sup> de piridoxina e 0,5mg. L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico (RIBEIRO et al., 2010). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 e, em seguida, submetido à esterilização em autoclave, a 120°C, durante 15 minutos. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento, à temperatura constante de 25±2 °C, na ausência de luz durante os primeiros trinta dias, após isso a plântulas permaneceram sob fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 42W m<sup>-2</sup>.

Durante 37 dias após a inoculação *in vitro* as plântulas foram retiradas em intervalos irregulares para as análises de cada estrutura, estimando o conteúdo de DNA e coeficiente de variação (CV).

## 2.2 Estimativa do conteúdo de DNA por citometria de fluxo

Foi retirada uma porção de aproximadamente 1 cm de cada uma dessas estruturas, que foram trituradas em placa de Petri contendo 1 mL de tampão Marie gelado para a liberação dos núcleos (MARIE; BROWN, 1993) [50 mM glicose, 15 mM NaCl, 15 mM KCl, 5 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 50 mM citrato de sódio, 0.5% Tween 20, 50 mM HEPES (pH 7.2) e 1% (m/v) polivinilpirrolidona-10 (PVP-10)]. A suspensão de núcleos foi aspirada através de duas camadas de gaze, com auxílio de uma pipeta plástica e filtrada através de uma malha de 50 µm. Os núcleos foram corados pela adição de 25 µL de uma solução de 1mg/1mL de iodeto de propídeo a cada amostra.

O mesmo procedimento foi realizado para o preparo do padrão de referência externo (*Pisum sativum* com 9,09 pg). Para cada amostra, 10 mil

núcleos foram avaliados utilizando-se uma escala logarítmica. A análise foi realizada no citômetro FACS Calibur (BD, Biosciences, San Jose, CA, USA) e os histogramas obtidos com o *software* Cell Quest e analisados estatisticamente no *software* WinMDI 2.8. (Scripps 43 Research Institute, 2011). O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado utilizando-se a razão entre as intensidades de fluorescência dos núcleos G1 do padrão de referência e dos núcleos G1 da amostra, multiplicando-se essa razão pela quantidade de DNA do padrão de referência. Os conteúdos de DNA (pg) e coeficiente de variação (CV) obtidos foram submetidos a análises de variância e as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott no programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

### **2.3 Análises biométricas**

Complementarmente no momento de cada coleta foram mensurados o comprimento e diâmetro do embrião, pecíolo cotiledonar, bainha, haustório, raiz e folha que foram obtidos com auxílio de paquímetro digital e também foram realizadas fotomicrografias obtidas em microscópio óptico Zeiss Stemi 2000-C e estereomicroscópio Primo Star Zeiss, ambos com câmera digital Cannon A-650/S, acoplada. Para cada estrutura foram realizadas 10 repetições e para as descrições morfológicas foram usadas as terminologias empregadas por Henderson (2006) e Panza, Láinez e Maldonado (2004).

### **2.4 Anatomia das plântulas e embriões**

Para caracterizar, o material de *B. capitata*, foram tomadas amostras de 10 plântulas aos 8 e 16 dias, épocas que foram constatadas maior presença de idioblastos contendo fenólicos para *B. capitata*. O material foi fixado em FAA50 (JOHANSEN, 1940) por 24 horas, com passagem em vácuo, desidratado em série etílica e estocado em etanol 70% (JENSEN, 1962). Parte das amostras foi incluída em metacrilato, seguindo metodologia

proposta por Paiva, Pinho e Oliveira (2011). Cortes transversais e longitudinais (6 - 7  $\mu\text{m}$ ) foram obtidos em micrótomo rotativo e corados com azul de toluidina 0,05%, em pH 6,8 (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964) e montados entre lâmina e lamínula com resina (Entellan®). As fotomicrografias foram obtidas em microscópio óptico Zeiss Stemi 2000-C e estereomicroscópio Primo Star Zeiss, ambos com câmera digital Cannon A-650/S, acoplada.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variáveis conteúdo de DNA e coeficiente de variação apresentaram diferenças estatísticas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de médias Skott Knott. O conteúdo de DNA nas amostras variou conforme estrutura e períodos de cultivo *in vitro* em *B. capitata*. As variações observadas podem ser devido a vários fatores internos (intrínsecos do material vegetal) ou externos, que varia desde toda metodologia de preparo das amostras até o momento da leitura no citômetro. Essas diferenças são expressas em um coeficiente de variação (CV=desvio padrão/média) que, geralmente, varia de 1 a 10%, em células vegetais. De acordo com Marie e Brown (1993), o CV é um critério elementar na validação de métodos citológicos que definem uma gama de valores entre 1% e 2%, para análises de alta qualidade e 3%, como valor de rotina.

O CV está diretamente relacionado à qualidade das amostras, portanto, quanto menor, maior será a confiabilidade das análises. Assim sendo, é possível afirmar que os tratamentos: embrião, pecíolo cotiledonar 37 dias, radícula 37 dias, bainha 37 dias, folha 37 dias e folha da planta adulta apresentaram os menores CV's obtendo, portanto, os índices de DNA mais confiáveis (Tabela 1). O CV do tratamento haustório 8 dias foi o mais alto, seguido dos tratamentos pecíolo cotiledonar 8 dias e haustório 16 dias, sugerindo assim que existe alguma influência de fatores internos ou externos prejudicando a qualidade das amostras (Tabela 1). Uma das hipóteses é que esse fato pode estar relacionado à produção de metabólitos secundários que se ligam ao DNA e produzindo um fenômeno denominado de *self-tanning* que pode ocasionar variação na quantidade de DNA (GREILHUBER, 2007). Os metabólitos secundários podem comprometer a coloração do DNA em plantas intercalando-se no mesmo, causando imprecisão nas estimativas do tamanho do genoma. A espécie *Musa acuminata*, por exemplo, apresenta um teor significativo de compostos fenólicos que prejudica a qualidade final das análises de plantas *in vitro* (CAMOLESI et al., 2007), uma vez que, no

momento do preparo das amostras, esses compostos precipitam, dificultando a leitura no citômetro.

Tabela 1 Conteúdo de DNA e coeficiente de variação (CV) de *Butia capitata* do embrião, plântulas cultivadas *in vitro* e folha da planta adulta

Tratamentos	DNA (pg)	CV(%)
Embrião	3,99 a	0,59 a
Pecíolo cotiledonar 8 dias	5,17 c	1,45 c
Haustório 8 dias	5,03 c	1,81 d
Pecíolo cotiledonar 16 dias	4,38 a	0,82 b
Radícula 16 dias	4,19 a	0,84 b
Bainha 16 dias	4,03 a	0,87 b
Haustório 16 dias	4,20 a	1,43 c
Pecíolo cotiledonar 27 dias	4,61 b	0,59 a
Radícula 27 dias	4,55 b	0,63 a
Bainha 27 dias	4,56 b	0,60 a
Haustório 27 dias	4,65 b	1,58 c
Pecíolo cotiledonar 37 dias	4,15 a	0,55 a
Radícula 37 dias	4,08 a	0,54 a
Bainha 37 dias	4,23 a	0,42 a
Folha 37 dias	4,05 a	0,55 a
Folha planta adulta	4,44 a	0,54 a

\*médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem a um mesmo grupo e não diferem entre si pelo teste de médias Scott-Knott a 5% de probabilidade

Grande parte da diversidade genética expressa em plântulas obtida de cultura de tecidos, incluindo alterações do nível de ploidia, podem resultar de danos causados pelo estresse oxidativo nos tecidos da planta.

Os menores conteúdos de DNA foram observados para o embrião, folha aos 37 dias, folha da planta adulta e pecíolo cotiledonar (8, 16 e 37 dias), radícula (16 e 37 dias), bainha (16 e 37 dias). (Tabela 1). No entanto, os índices de DNA dessas estruturas analisadas aos 16 dias tiveram CV's mais altos, indicando baixa precisão.

Aos 27 dias após a inoculação *in vitro* para pecíolo cotiledonar e radícula foi verificada a mesma quantidade de DNA, estando os valores de DNA intermediários aos citados anteriormente. Os CV's desses tratamentos foram menores, confirmando assim que esses resultados possuem alta confiabilidade.

Aos 8 dias no pecíolo cotiledonar e haustório foram observados os maiores conteúdos de DNA. No entanto, os CV's foram muito elevados, indicando que há interferência de algum fator interferindo na quantidade de DNA. Nessa fase observa-se no cotilédone o início da emissão da radícula (Fig. 2B). Há uma intensa produção de compostos fenólicos secundários (Fig. 2B; E). Essas substâncias têm sido comumente encontradas no cotilédone de algumas palmeiras, onde células contendo fenólicos formam uma faixa cônica na região proximal do embrião (PANZA et al., 2004; SUGIMUMA; MURAKAMI, 1990). Em *B. capitata* a presença de inúmeros idioblastos contendo fenólicos externos à coifa podem, provavelmente, atuar na proteção contra o ataque de patógenos (WERKER, 1997), além de contribuir com a protrusão do sistema radicular. É possível que tais compostos fenólicos presentes possam ter intercalado ao fluorocromo comprometendo a estimativa do conteúdo de DNA. Fenóis afetam a acessibilidade do corante ao DNA, e podem ser uma fonte de erro estequiométrico da estimativa de conteúdo de DNA (NOIROT et al., 2000). Nos estudos Thiem e Śliwińska (2003) com *Rubus chamaemorus* a presença de fenóis no tecido foliar levou os autores a modificar a composição do tampão de isolamento com a adição de diferentes concentrações de um antioxidante PVP- 10 (0,5, 1 e 2%). Em *E. guieensis* calos diferiram em quantidade de DNA (3,12 pg), para plantulas aclimatadas e sementes com conteúdo de DNA aproximadamente de 3,7 pg (RIVAL et al., 1997). Em *A. aculeata* o conteúdo de DNA da folha foi de aproximadamente 5,81 pg (ABREU et al., 2011).

Nas sementes de palmeiras o haustório expande-se para absorver as reservas do endosperma, *in vitro* essa estrutura não se expande de modo que

a degeneração do haustório é consequência natural, fato esse observado por Magalhães et al. (2013) para *B. capitata*. Observou-se uma grande quantidade de compostos fenólicos nessa estrutura. Provavelmente, isso pode ter comprometido a leitura e favorecido a um maior CV.

Foram observadas também diferenças no conteúdo de DNA das mesmas estruturas ao longo do tempo. No caso do pecíolo cotiledonar aos 8 dias apresentou 5,17 pg, aos 16, 4,38 pg, aos 27, 4,61 pg e aos 37 dias 4,15 pg. O mesmo aconteceu com o haustório, cujo conteúdo de DNA variou de 5,03 pg aos 8 dias, 4,20 pg aos 16 e 4,65pg aos 27 dias. Entretanto, os histogramas com as distribuições obtidas apresentam sempre variações, já que as medições do conteúdo de DNA não são perfeitas (LOUREIRO; SANTOS, 2004). Essas diferenças também podem ser devido ao conteúdo 2C de DNA nuclear ser altamente plástico em resposta as condições de cultivo (MSOGOYA; GROUT; ROBERTS, 2011). No entanto, o conteúdo de DNA da radícula e bainha foi mais estável e quase não variou ao longo dos períodos estudados. As folhas tanto da planta adulta quanto *in vitro* aos 37 dias, bem como o embrião também não sofreram diferenças significativas no conteúdo de DNA.

A figura 1 ilustra histogramas de citometria de fluxo do conteúdo de DNA. Nesses histogramas sempre o primeiro pico formado se refere ao pico G1 da interfase das diferentes estruturas analisadas e o segundo, ao pico G1 do padrão de referência (*Pisum sativum*).

É possível observar que os melhores histogramas foram obtidos com os tratamentos pecíolo cotiledonar e bainha aos 37 dias (Fig. 1D; E). Esses histogramas apresentaram picos extremamente finos e limpos. Quanto mais fino o pico, menor o cv. O histograma referente à folha adulta, apesar de ter apresentado pico fino e baixo cv, apresentou-se bastante dentado, com um arraste ruim, à esquerda dos picos, apresentando um histograma de qualidade intermediária.

Já o haustório e o pecíolo cotiledonar aos 8 dias, apresentaram os piores resultados, isso pode ser observado nos histogramas, com picos

bastante grossos, muito dentados e com muito arraste, implicando assim na baixa confiabilidade dos resultados (Fig. 1F; G).



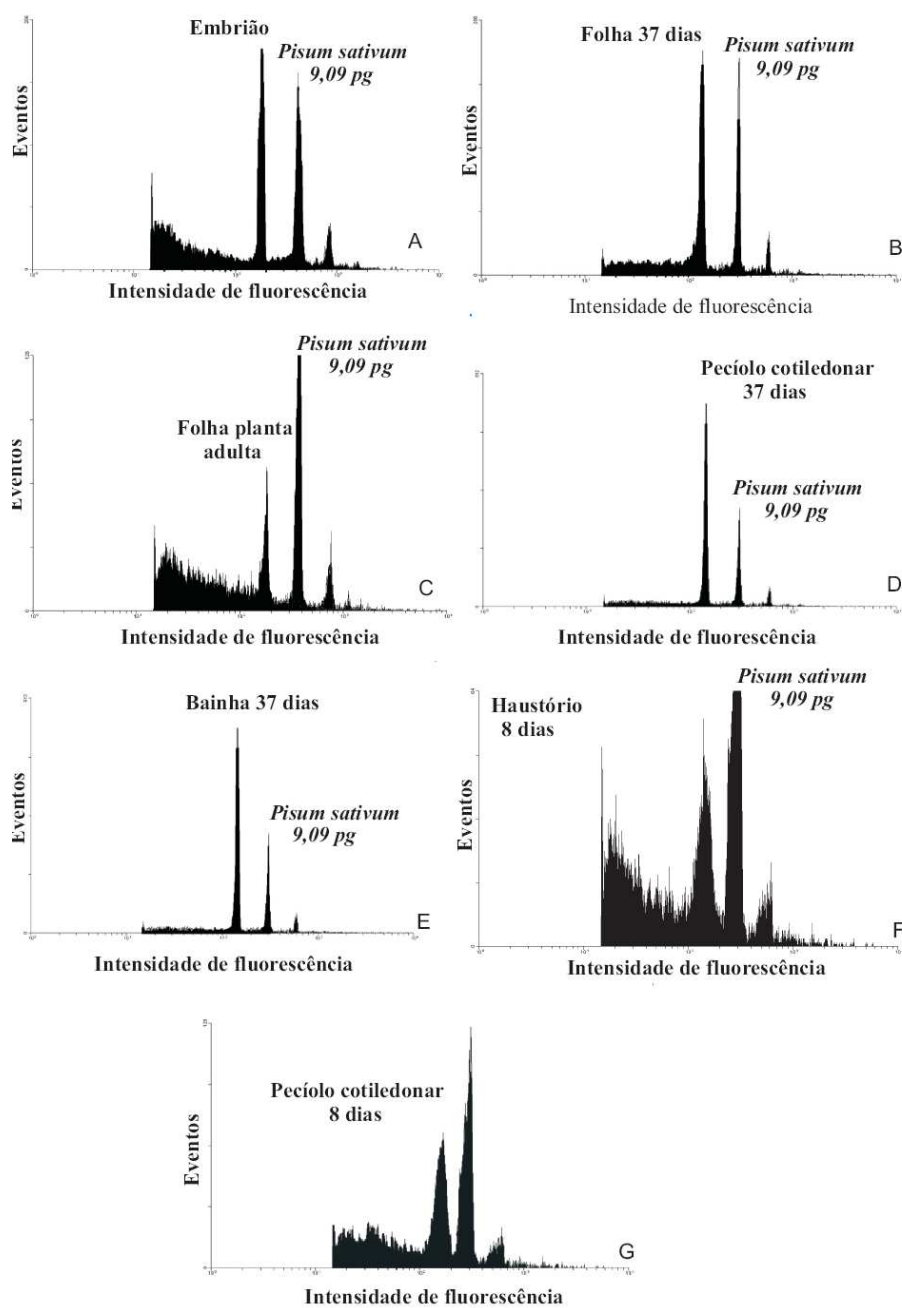


Figura 1 Histogramas de citometria de fluxo para quantificação de DNA. A) embrião; (B) folha aos 37 dias pós-cultivo; (C) folha da planta adulta; (D) pecíolo cotiledonar aos 37 dias; (E) bainha aos 37 dias; (F) haustório 8 dias; (G) pecíolo cotiledonar aos 8 dias

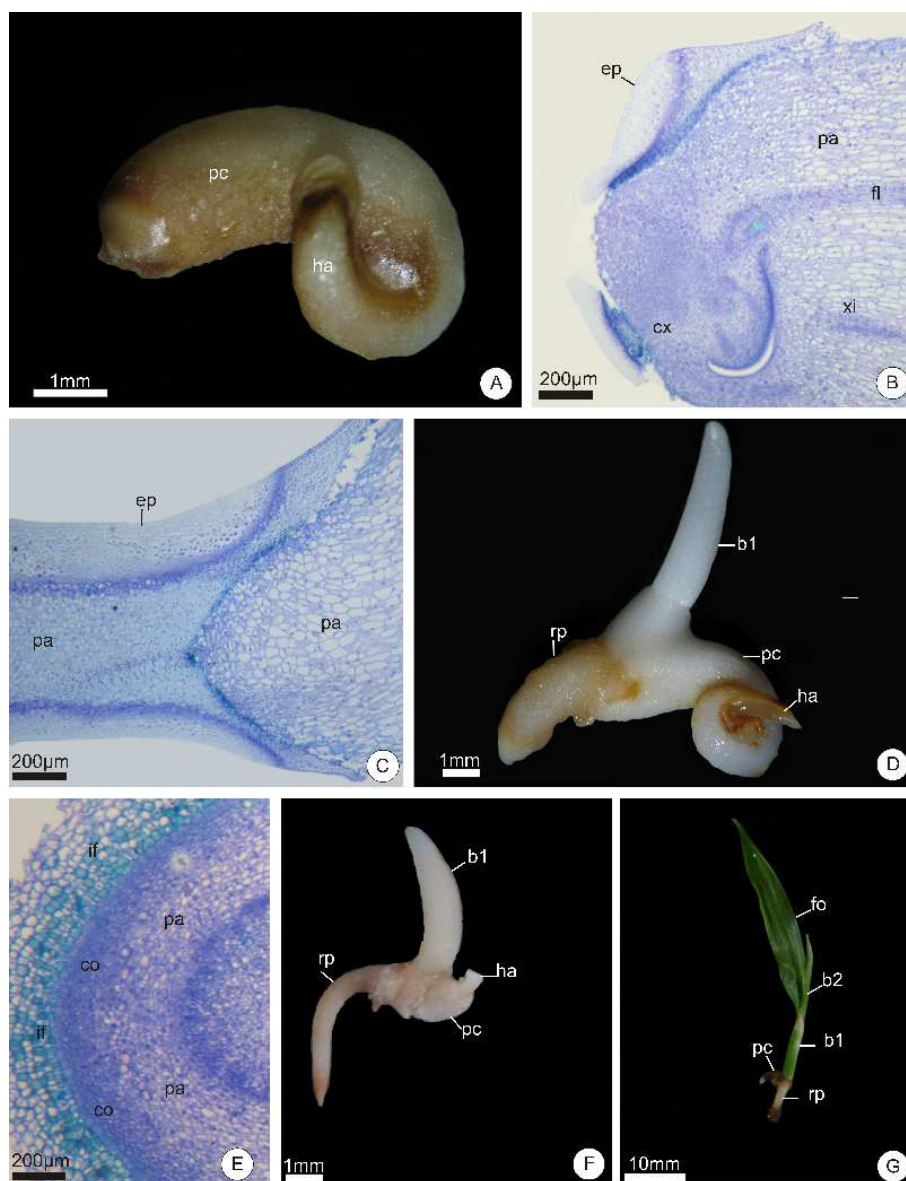


Figura 2 Estrutura das plântulas e germinação *in vitro* de *Butia capitata* Secções longitudinais (B,C, E); (A) plântula aos 8 dias; (B) base do pecíolo cotiledonar com faixa fenólica e a raiz aos 8 dias; (C) haustório aos 8 dias; (D) plântula aos 16 dias; (E) Raiz; (F) plântula 30 dias; (G) plântula 37 dias. (b1: primeira bainha; b2: segunda bainha; co: coifa; cx: córtex; ep: epiderme; fo: folha; fl: floema; If: idioblastos fenólicos; ha: haustório; pa: parênquima; pc: pecíolo cotiledonar; rp: raíz primária; xi: xilema)

Em grande parte dos trabalhos que envolvem a padronização de protocolos para a análise de DNA em citometria de fluxo contemplam fatores como o tipo de tampão de extração do DNA, doses de fluorocromos, tempo de extração das amostras, espécie de padrão, dentre outros. É importante que o material vegetal esteja bem caracterizado para que em análises futuras e os resultados obtidos possam ser reproduzíveis e confiáveis. No processo germinativo de *B. capitata* o pecíolo cotiledonar expandiu-se em um primeiro momento até por volta de 6 cm, quando então essa estrutura permaneceu estabilizada com pouco crescimento (Fig. 3). Da mesma forma o haustório se expandiu até por volta dos 12 dias do cultivo *in vitro*, quando então começou a se degenerar (Fig. 3 e 4). Os compostos fenólicos presentes em grande quantidade nessa estrutura provavelmente possuem algum papel nessa fase. A raiz inicia sua protrusão por volta dos 8 dias, entretanto, somente pode ser mensurada a partir dos 12 dias, juntamente com a primeira bainha, ambas as estruturas continuam seu desenvolvimento ao longo do cultivo *in vitro* expandindo-se em comprimento e diâmetro (Fig. 3; 4). Por volta dos 16 dias de cultivo, foi possível verificar a raiz primária e primeira bainha bem desenvolvidas (Fig. 2F), já os 37 dias o limbo foliar encontrou-se totalmente desenvolvido e expandido (Fig. 2G).

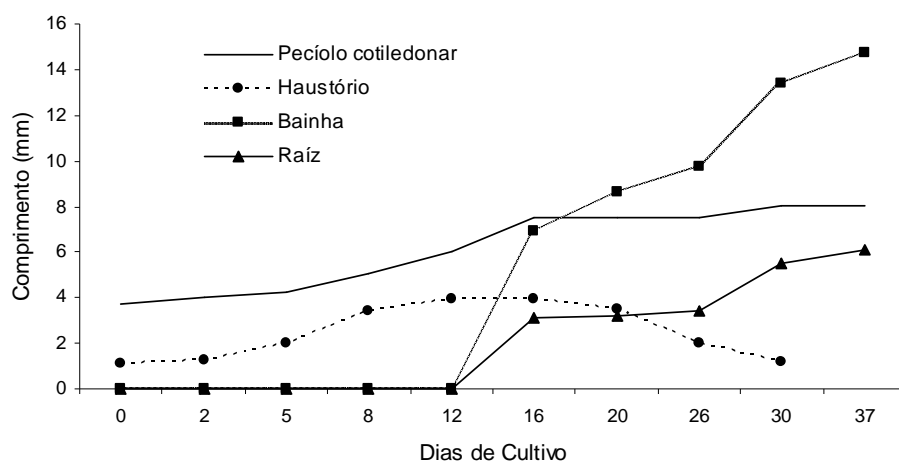


Figura 3 Crescimento em comprimento das partes da plântula de coquinho-azedo até os 37 dias de cultivo *in vitro*

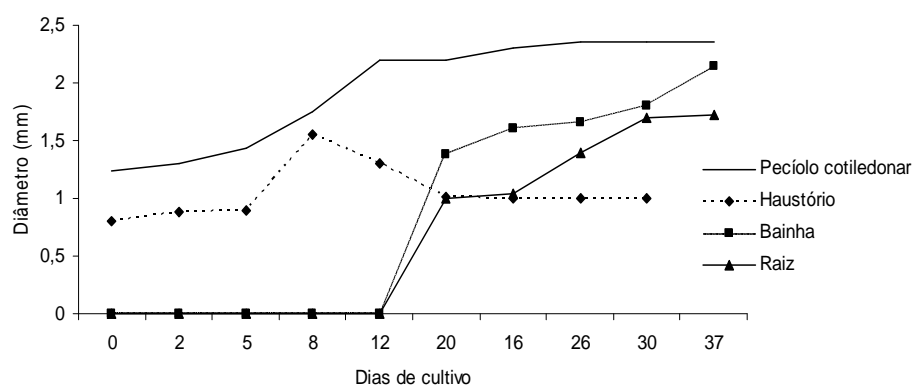


Figura 4 Crescimento em diâmetro das partes da plântula de coquinho-azedo até os 37 dias de cultivo *in vitro*

#### 4 CONCLUSÕES

O conteúdo de DNA das diferentes estruturas de *Butia capitata* varia de 3,99 pg (em embriões) até 5,17 pg (em pecíolo cotiledonar).

As estruturas pecíolo cotiledonar e haustório aos 8 dias do cultivo *in vitro* têm seu conteúdo de DNA alterados ao longo dos períodos de avaliação apresentando altos coeficientes de variação.

Bainha, pecíolo cotiledonar e radícula apresentam os menores coeficientes de variação e quantidades iguais de DNA, sendo essas estruturas as mais confiáveis para análise do tecido em *B. capitata*.

Metabólitos secundários provavelmente interferem na qualidade das amostras.

## REFERÊNCIAS

ABREU, I. S. et al. First karyotype, DNA C-value and AT/GC base composition of macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) –a promising plant for biodiesel production. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 59, p.149–155, 2011. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=BT10245>>. Acesso em: 22 ago. 2013

BENNETT, M. D.; PRICE, J.; JOHNSTON, J. S. Anthocyanin Inhibits Propidium Iodide DNA Fluorescence in *Euphorbia pulcherrima*: Implications for Genome Size Variation and Flow Cytometry. **Annals of Botany**, London, v. 101, p. 777–790, 2008. Disponível em: <<http://aob.oxfordjournals.org/content/101/6/777.short>>. Acesso em: 22 ago. 2013

CAMOLESI, M. R. et al. Redução da oxidação na propagação *in vitro* da bananeira ‘Maçã’. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1237-1241, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v31n4/44.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2013

FARIA, J. P. et al. Caracterização da polpa do coquinho-azedo (*Butia capitata* var *capitata*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 827-829, 2008.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GALBRAITH, D. W. et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plants tissues. **Science**, Cambridge, v. 220, p. 1049–1051, 1983. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/220/4601/1049.short>>. Acesso em: 26 fev. 2013

GREILHUBER, J. et al. **Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes**. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. 99 p.

HENDERSON, F. M. Morphology and anatomy of palm seedlings. **The Botanical Review**, New York, v. 72, n. 4, p. 273-329, 2006. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/kq447q1571584247/fulltext.pdf>>. Acesso em: 23 ago. 2009

JAMNADASS, R.; LOWE, A.; DAWSON, I. Molecular Markers and the Management of Tropical Trees: the Case of Indigenous Fruits. **Tropical plantbiology**, Cham, v. 2, p. 1–12, 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12042-008-9027-9#page-1>>. Acesso em: 25 set. 2013.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.

LORENZI, H. et al. **Flora brasileira Lorenzi: Arecaceae** (palmeiras). Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2010. 384 p.

LOUREIRO, J. C. M.; SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, v. 77, p. 18-29, abr. 2004.

LOUREIRO, J. et al. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. **Annals of Botany**, London, v. 98, p. 679–689, 2006. Disponível em: <<http://aob.oxfordjournals.org/content/98/3/679.short>>. Acesso em: 25 set. 2013.

MAGALHÃES, H. M. et al. Structure of the zygotic embryos and seedlings of *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees**, Berlin, v. 27, n. 1, p. 273-283, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00468-012-0797-1#page-1>>. Acesso em: 25 set. 2013.

MARIE, D.; BROWN, S. C. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C-values for 70 species. **Biology of the Cell**, Paris, v. 78, n. 1-2, p. 41-51, 1993. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/024849009390113S>>. Acesso em: 25 set. 2013.

MSOGOYA, T. J.; GROUT, B. W.; ROBERTS, A. Reduction in genome size and DNA methylation alters plant and fruit development in tissue culture induced off-type banana (*Musa* spp.). **Journal of Animal & Plant Sciences**, Nairobi, v. 11, n. 3, p. 1450-1456, 2011. Disponível em: <<http://m.elewa.org/JAPS/2011/11.3/4.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NOIROT, M. et al. Nucleus– cytosol interactions—a source of stoichiometric error in flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. **Annals of Botany**, London, v. 86, p. 309–316, 2000. Disponível em: <<http://aob.oxfordjournals.org/content/86/2/309.short>>. Acesso em: 25 set. 2013.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, New York, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

OCHATT, S. J. Flow cytometry in plant breeding. **Cytometry Part A**, Hoboken, v. 73A, p. 581- 598, 2008.

PAIVA, É. A. S.; PINHO, S. Z.; OLIVEIRA, D. M. T. Large plant samples: how to process for GMA embedding? In: CHIARINI-GARCIA, H.; MELO, R. C. N. (Org.). **Light microscopy: methods and protocols**. Totowa: Humana, 2011.

PANZA, V.; LÁINEZ, V.; MALDONADO, S. Seed structure and histochemistry in the palm *Euterpe edulis*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 145, n. 4, p. 445-453, 2004. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1095-8339.2004.00293.x/abstract>>. Acesso em: 15 fev. 2010.

RIBEIRO, L. M. et al. Critérios para o teste de tetrazólio na estimativa do potencial germinativo em macaúba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 4, p. 361-368, 2010.

RIVAL, R. et al. Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) tissue cultures and seed-derived plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, p. 884- 887, 1997. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s002990050339#page-1>>. Acesso em: 15 set. 2013.

SUGIMUMA, Y.; MURAKAMI, T. Structure and function of the haustorium in germinating coconut palm seed. **JARQ: Japan agricultural research quarterly**, Paris, v. 24, n. 1, p. 1-14, 1990.

THIEM, B.; SLIWINSKA, E. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) *in vitro* cultures. **Plant Science**, Limerick, v. 164, p.129-134, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945202003448>>. Acesso em: 15 set. 2013.

WERKER, E. **Seed anatomy**. Berlin: G. Borntraeger, 1997. 404 p. (Handbuch der Pflanzenanatomie).