

DIFERENCIAÇÃO GENÔMICA REVELA NOVO MORFOTIPO DE *Euterpe edulis* Mart. PARA O ESPÍRITO SANTO

Jônatas Gomes Santos¹, Francine Alves Nogueira de Almeida², Adésio Ferreira¹, Marcia Flores da Silva Ferreira¹.

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Alto Universitário, S/N, Guararema – 29500-000 – Alegre – ES, Brasil, gomesjonatas21@gmail.com, adésioferreira@gmail.com, mfloressf@gmail.com.

²Universidade Estadual de Campinas/ Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética Av. Cândido Rondon, 400 - Cidade Universitária - 13083-875 - Campinas-SP, Brasil, frannogueir2@gmail.com.

Resumo

As diferenças morfológicas e genéticas observadas em indivíduos de *Euterpe edulis* denominados Santa Marta, dão indícios para considerá-lo como um morfotipo para a espécie. Análises de marcadores moleculares podem determinar se há algum grau de diferenciação genética das populações. Objetivou-se verificar a diferenciação de indivíduos de Santa Marta em relação a indivíduos de *E. edulis* do Espírito Santo (ES), utilizando marcadores SNPs. A análise de agrupamento e diversidade genética foram realizadas com os pacotes dartR, poppr e hierfstat no software R, utilizando 1.177 SNPs e 405 indivíduos, dos quais 15 foram identificados como Santa Marta. Quatro grupos explicaram a diferenciação dos indivíduos. A análise de diversidade utilizando o G2, foi observado um $H_e = 0.20$ e $H_o = 0.17$ para Santa Marta, enquanto para os demais indivíduos foi de $H_e = 0.26$ e $H_o = 0.13$. O valor de $K=5$, demonstrou estruturação de indivíduos de Santa Marta, e mistura elevada entre os indivíduos de *E. edulis*. Os resultados evidenciaram a diferença genética entre os indivíduos de Santa Marta e *E. edulis*, indicando uma possível interrupção do fluxo gênico entre as variações morfológicas.

Palavras-chave: Diversidade Genética, Santa Marta, SNP, Variação Morfológica.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas; Genética.

Introdução

O Estado do Espírito Santo apresenta uma grande biodiversidade, sendo mais de 6,200 espécies nativas e 516 espécies endêmicas (DUTRA et al., 2015). Em *Euterpe edulis*, é relatada a ocorrência de uma variação morfológica da espécie, denominada de Santa Marta. Produtores do Espírito Santo têm se referido a essa variação morfológica como uma "espécie" de *Euterpe edulis* devido às diferenças observáveis na morfologia. Estes indivíduos são relatados por serem plantas altas, de maior diâmetro do caule, maior tamanho de cachos e frutos, e apresentarem tons arroxeados na região do meristema, onde as folhas são inseridas. Os proprietários de uma plantação comercial de *E. edulis* que contém alguns indivíduos de Santa Marta, em Rio Novo do Sul (ES), afirmam que as sementes que deram origem aos indivíduos de Santa Marta foram oriundas do município de Vargem Alta no Espírito Santo.

A diversidade genética de *Euterpe edulis* no Espírito Santo já foi relatada em vários estudos utilizando populações de diferentes locais do estado e do Brasil (MORAES et al., 2020; MENGARDA et al., 2022; PEREIRA et al., 2022; ALMEIDA et al., 2024). A espécie apresenta uma alta diversidade genética sobretudo no Espírito Santo que, juntamente com Rio de Janeiro, é considerado uma zona híbrida onde ocorre a mistura de pools gênicos do Sul e do Nordeste do Brasil (PEREIRA et al., 2022). Um estudo utilizando marcadores microsatélites e indivíduos coletados em Rio Novo do Sul e indivíduos de Santa Marta provenientes de sementes obtidas do distrito de Santa Marta em Vargem Alta - ES, apresentaram diferenciação genética e formaram grupos divergentes dos demais indivíduos de *E. edulis* de acordo com as análises de agrupamento (MENGARDA et al., 2022).

As diferenças morfológicas e genéticas relatadas para indivíduos de Santa Marta (MENGARDA et al., 2022), sugerem a ocorrência de um morfotipo de *Euterpe edulis* ou plasticidade fenotípica em

populações da espécie. Neste sentido, o uso de características moleculares e morfológicas são úteis na determinação de grau de diferenciação entre as populações ou se trata de uma variação ambiental.

Diante disso, o presente estudo tem como objetivo verificar a diferenciação genética de Santa Marta em relação a *E. edulis* de ocorrência no Espírito Santo, utilizando 1,177 marcadores SNPs.

Metodologia

Locais de coleta e material vegetal

Foram utilizados 405 indivíduos para as análises de diversidade genética, sendo: 390 indivíduos de *Euterpe edulis* foram coletados em uma população manejada localizada no município de Rio Novo do Sul, no Espírito Santo. Os indivíduos deste local possuem mais de 30 anos e fazem parte de um remanescente de Floresta Atlântica pertencentes a duas empresas de processamento de frutos, Açai Juçara e Bonalotti. Os 15 indivíduos de *Euterpe edulis* denominados Santa Marta foram coletados no município de Vargem Alta, Espírito Santo. Os indivíduos coletados possuem entre 15 e 25 anos de idade e são encontrados em locais próximo a plantações de citrus e café (*Coffea*). No decorrer do texto, a variação morfológica será chamada por “Santa Marta”.

Extração de DNA e genotipagem, processamento e qualidade de SNPs

A extração do DNA genômico foi realizada a partir do estipe, seguindo o protocolo Doyle Doyle (1990) com adição de CTAB no método (CARVALHO et al., 2020; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). O protocolo foi adaptado para 3 passos de lavagem com clorofórmio álcool isoamílico (24:1) e precipitação sem acetato de amônia. 76 A concentração e pureza do DNA foi verificada em Nanodrop®, sendo as amostras cuja razão 260/280 apresentaram-se entre 1.8 e 2.0 foram enviadas para genotipagem. O DNA foi preparado utilizando a metodologia DArTseq e enviados para o Genetic Analysis Service for Agriculture Laboratory (SAGA in Spanish, Texcoco – México). A redução de complexidade do DNA foi realizada utilizando duas enzimas de restrição MseI e HpaII (SANSALONI et al., 2011). Após este passo, os fragmentos de DNA foram ligados a adaptadores utilizados para reconhecimento da amostra pelo sequenciador Illumina Novaseq 6000 e outro para identificação das amostras (SANSALONI et al., 2011). Os SNPs foram filtrados utilizando o pacote dartR que classifica os SNPs como ‘0’ homozigoto para o alelo de referência, ‘1’ alelo heterozigoto para o SNP e ‘2’ sendo homozigoto para o alelo alternativo. Os seguintes parâmetros de filtragem foram utilizados: call rate com threshold de 0,80, o parâmetro de reprodutibilidade em 0,985 e o MAF (frequência do menor alelo) de 0,01. Após as filtrações foram mantidos 1,177 SNPs para as análises posteriores.

Análise de agrupamento e estruturação genética

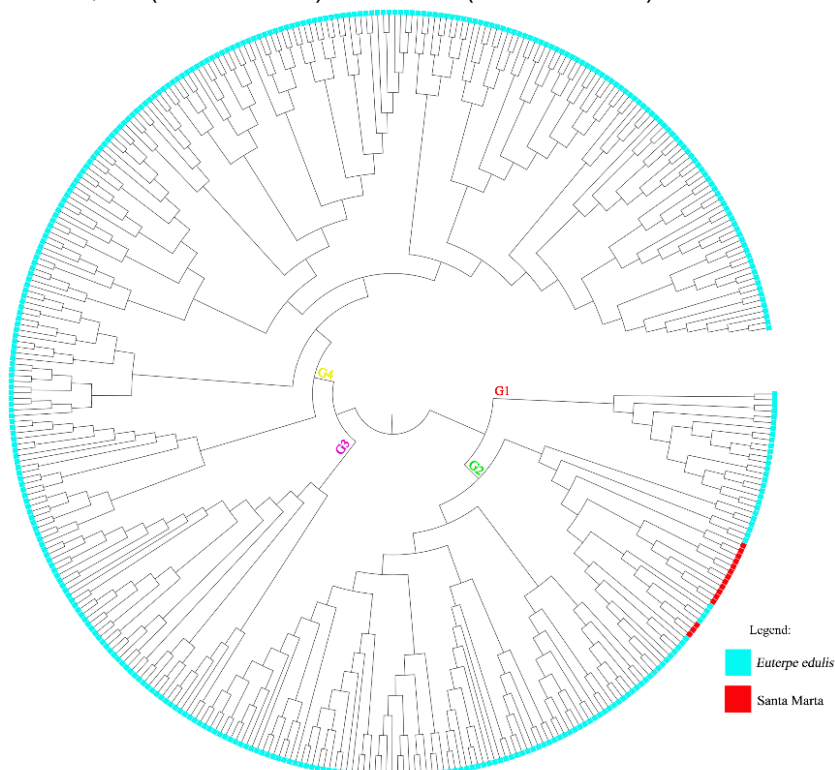
A análise de distância genética foi realizada utilizando a função “rogers.dist” do pacote poppr (KAMVAR et al., 2014) e UPGMA como método de agrupamento. Em seguida, foi realizada uma representação da matriz de distância por meio de um dendrograma, juntamente com a análise de bootstrap, utilizando a função “aboot” do pacote poppr (KAMVAR et al., 2014). A edição do agrupamento foi realizada utilizando a versão livre do iTOL: Interactive Tree of Life, disponível em: iTOL: Interactive Tree Of Life. Os parâmetros de diversidade genética, heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o) foram estimados utilizando os pacotes “hierfstat” (GOUDET, 2005) e “poppr” (KAMVAR et al., 2014). A análise de estrutura populacional foi realizada utilizando o pacote “LEA” v2.8.0 (FRICHOT e FRANÇOIS, 2015) no software R (RStudio Team, 2022). As análises de F_{ST} e diversidade foram realizadas utilizando o pacote hierfstat e poppr no software R.

Resultados

Na análise de agrupamento por dados de SNPs genômicos dois grandes grupos, foram formados, os quais foram subdivididos em outros dois cada. No grupo G1 foram agrupados 21 indivíduos, no G2 119 indivíduos, dos quais 15 são de Santa Marta. Destaca-se que entre os indivíduos de Santa Marta estão quatro indivíduos de *E. edulis* de Rio Novo do Sul. Nos grupos G3 e G4 agruparam-se 41 e 224 indivíduos de *E. edulis*, respectivamente (Figura 1).

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Figura 1. Agrupamento com SNPs, utilizando a distância de Roger evidenciou a formação de quatro grupos. As cores representam as variações morfológicas, ciano – *E. edulis*; vermelho -Santa Marta. Os grupos genéticos considerados estão indicados no agrupamento : G1 – vermelho (21 indivíduos); G2 (119 indivíduos) – verde; G3 (41 indivíduos)– lilás e G4 (224 indivíduos)– amarelo.



Fonte: Jônatas Gomes Santos (2024)

A fim de verificar a diversidade genética de Santa Marta e *E. edulis*, foi realizada uma análise de diversidade utilizando apenas os indivíduos do G2 (Tabela 1). A análise de diversidade revelou uma heteroziguidade observada (H_o) e heteroziguidade esperada (H_e) maiores para *Euterpe edulis*. Os valores das métricas de diversidade foram mais baixos em Santa Marta (Tabela 1). O valor de F_{ST} observado para as populações foi alto, indicando uma diferenciação entre Santa Marta e *Euterpe edulis*.

Tabela 1. Parâmetros de diversidade de *Euterpe edulis* e Santa Marta considerando apenas os indivíduos do G2 (verde). Heteroziguidade observada (H_o), heteroziguidade esperada (H_e) e F_{ST} .

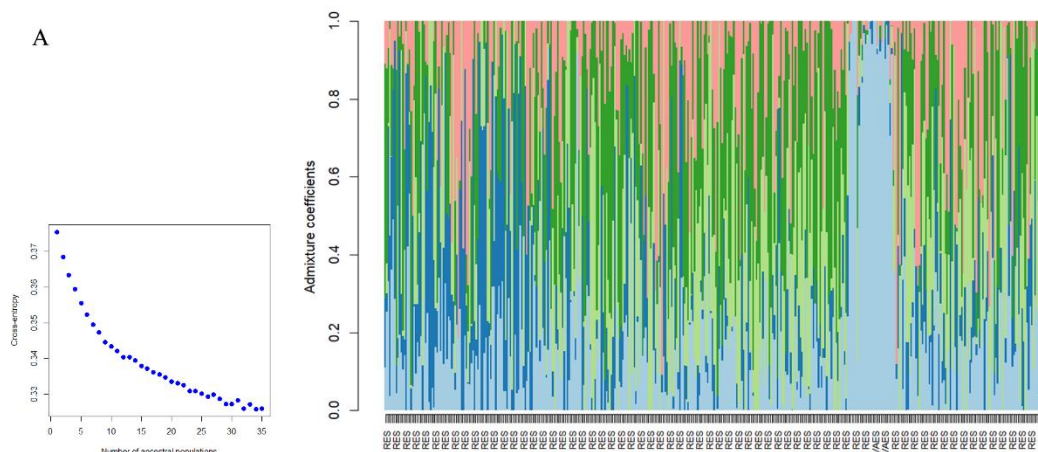
Morfotipo	H_o	H_e	F_{ST}
<i>Euterpe edulis</i> (n=125)	0.236	0.261	0.08
Santa Marta (n=15)	0.174	0.200	

H_o = número de homozigotos/número de indivíduos; H_e = $1 - (p^2 + q^2)$;

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Na análise de estruturação genética não identificou um valor de K que explicasse significativamente os grupos genéticos das variações morfológicas considerando que não houve uma estabilização do número de populações ancestrais (Figura 2a). Diante disso, o valor de K foi considerado o número de grupos definidos com base no agrupamento realizado com distância de Rogers, utilizando o método de determinação de grupos de Mojená que definiu a formação de 5 grupos. A análise de F_{ST} corrobora os dados encontrados na análise de estruturação realizada no LEA, evidenciando um $F_{ST} \leq 0,08$.

Figura 2. Análise de estrutura populacional de 405 indivíduos de *Euterpe edulis* coletados no Espírito Santo. Número de populações ancestrais que deveria definir o valor de K mais significativo que explicasse a distribuição dos indivíduos e contribuição dos grupos genéticos para os indivíduos das populações, utilizando o K=5.



Fonte: Jônatas Gomes Santos (2024)

Discussão

A distribuição dos indivíduos de *E. edulis* no agrupamento evidencia a diversidade genética no local onde os indivíduos são encontrados. Outros estudos utilizando marcadores microsatélite já relataram uma alta diversidade genética ($H_e=0.54$ e $H_o=0.35$) para *E. edulis* daquela localidade, em comparação com outras populações do estado (MORAES et al., 2020). Importante ressaltar que o local onde o *E. edulis* é encontrado faz parte de um remanescente de Floresta Atlântica, cujo número de indivíduos foi aumentado através de plantação manual de sementes de diferentes locais para produção de frutos.

O replantio de sementes nesse fragmento pode ter sido um fator que contribuiu para o aumento da diversidade. As de origens distintas dos materiais podem ter aumentado a variabilidade genética do local através de recombinação e troca de alelos. Os resultados da análise de diversidade realizada corroboram essas hipóteses, juntamente com outros estudos, como o realizado por Mengarda et al. (2022). Os autores avaliaram 199 indivíduos desta localidade utilizando nove marcadores microsatélites encontrando um H_o variando entre 0.29 e 0.78 e H_e variando entre 0.45 e 0.76.

No agrupamento os indivíduos de Santa Marta ficaram juntos em um mesmo clado, mas a presença de quatro indivíduos de *E. edulis* separaram o grupo. Este fato, pode estar associado à presença de indivíduos de Santa Marta no mesmo local que *E. edulis*, uma vez que, a origem dos indivíduos daquele local é diversa. Inclusive, no trabalho de Mengarda et al. (2022) os indivíduos de Santa Marta avaliados na população de Rio Novo do Sul apresentaram $H_o = 0.49$ e $H_e = 0.66$. A diversidade genética em populações, reflete a mistura de imigrantes de diferentes populações além da manutenção do tamanho efetivo populacional (CARVALHO et al., 2017; ORTEGO et al., 2015) em Rio Novo, pode estar relacionada à introdução de sementes de locais variados.

A análise de estruturação mostrou uma alta taxa de mistura entre os indivíduos de *E. edulis*, que pode estar relacionada à troca de alelos entre os indivíduos deste local. Este fator pode ser explicado, considerando que o fragmento onde o *E. edulis* é encontrado, apesar de apresentar uma extensão considerável, as plantas estão distribuídas a pouca distância uma das outras. Além disso, um dos principais dispersores de *E. edulis* são abelhas de pequeno porte que apresentam distância de voo relativamente curta (ZURBUCHEN et al., 2010), neste sentido, a troca de material entre as plantas pode estar sendo efetiva.

Em Santa Marta observa-se uma estruturação genética entre os indivíduos, com pouca taxa de mistura indicando uma diferenciação em relação a *E. edulis*. A diferença nos ambientes que uma espécie ocupa pode ocasionar diferenças intrapopulacionais em indivíduos de uma espécie (ARIDA et al., 2024). Além disso, em espécies autocompatíveis, a taxa de cruzamento pode ser altamente variável

entre as populações devido às diferenças na disponibilidade de polinizadores e fenologia de floração (CARVALHO et al., 2015).

Os indivíduos que, no agrupamento, ficaram posicionados entre os indivíduos de Santa Marta apresentaram um coeficiente de mistura semelhante ao dos indivíduos desta variação morfológica. Essa observação corrobora a hipótese de que esses indivíduos possuem a mesma origem que Santa Marta. A estruturação genética de Santa Marta corroborou com resultados de Mengarda et al. (2022), que detectou a maior diferenciação para o em uma análise de FST, por microsatélites (FST=0.205).

A diferenciação genética em uma população ocorre provavelmente devido a mudanças recentes causadas pela perda e fragmentação de habitat (CARVALHO et al., 2015; JOLY et al., 2014). A alteração do ambiente é um fator que influencia diretamente a estrutura das populações. A fragmentação das paisagens ocasiona a interrupção do fluxo gênico entre populações, menor mobilidade de polinizadores, redução de tamanho efetivo populacional causando uma interrupção no equilíbrio migração-deriva, onde os alelos perdidos por deriva genética podem não ser resgatados pelo fluxo gênico (CARVALHO et al., 2015).

Conclusão

As avaliações diversidade e estruturação genética entre Santa Marta e *Euterpe edulis* indicam diferenças no genoma, além de um determinado grau de isolamento entre as populações evidenciada pelo valor encontrado no FST. As diferenças genéticas observadas reforçam a hipótese pioneira do surgimento de um novo morfotipo de *Euterpe edulis* para o estado do Espírito Santo.

Referências

ARIDA, B. L. et al. Different but not isolated: absence of reproductive barriers and strong floral divergence between ecotypes of *Epidendrum fulgens* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 20 nov. 2024.

CANAL, G. B. et al. Genomic studies of the additive and dominant genetic control on production traits of *Euterpe edulis* fruits. *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, p. 9795, 16 jun. 2023.

CARVALHO, C. DA S. et al. Climatic stability and contemporary human impacts affect the genetic diversity and conservation status of a tropical palm in the Atlantic Forest of Brazil. *Conservation Genetics*, v. 18, n. 2, p. 467–478, 12 abr. 2017.

CARVALHO, C. S. et al. Contemporary and historic factors influence differently genetic differentiation and diversity in a tropical palm. *Heredity*, v. 115, n. 3, p. 216–224, 15 set. 2015.

CARVALHO, M. S. et al. Genetic diversity and population structure of *Euterpe edulis* by REML/BLUP analysis of fruit morphology and microsatellite markers Genetic diversity and population structure of *Euterpe edulis* by REML/BLUP analysis of fruit morphology and microsatellite markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 20, n. 4, p. 31662048, 2020.

CERQUEIRA, A. F. et al. Landscape conservation and maternal environment affect genetic diversity and the physiological responses of *Euterpe edulis* (Arecaceae) progenies to light availability. *Environmental and Experimental Botany*, v. 194, p. 104722, fev. 2022.

COELHO, G. M. et al. Genetic structure among morphotypes of the endangered Brazilian palm *Euterpe edulis* Mart (Arecaceae). *Ecology and Evolution*, v. 10, n. 12, p. 6039–6048, 1 jun. 2020.

DA SILVA CARVALHO, C. et al. Contemporary and historic factors influence differently genetic differentiation and diversity in a tropical palm. *Heredity*, v. 115, n. 3, p. 216–224, 14 set. 2015.

DE ALMEIDA, F. A. N. et al. Genetic diversity analysis of *Euterpe edulis* based on different molecular markers. *Tree Genetics & Genomes*, v. 20, n. 5, p. 31, 5 out. 2024.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília : [s.n.].

FRICHOT, E.; FRANÇOIS, O. LEA: An R package for landscape and ecological association studies. *Methods in Ecology and Evolution*, v. 6, n. 8, p. 925–929, 13 ago. 2015.

MENGARDA, L. H. G. et al. Genetic diversity of juçara palm: An alternative for selection and conservation in cash crop for fruit production. *Frontiers in Forests and Global Change*, v. 5, 6 out. 2022.

MORAES, M. C. DE et al. Genetic diversity in matrices and progenies of *Euterpe edulis* Mart. in managed area and in natural populations by microsatellites markers. *Ciencia Florestal*, v. 30, n. 2, p. 583–594, 2020.

ORTEGO, J.; GUGGER, P. F.; SORK, V. L. Climatically stable landscapes predict patterns of genetic structure and admixture in the Californian canyon live oak. *Journal of Biogeography*, v. 42, n. 2, p. 328–338, 25 fev. 2015.

PEREIRA, A. G. et al. Patterns of genetic diversity and structure of a threatened palm species (*Euterpe edulis* Arecaceae) from the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity*, v. 129, n. 3, p. 161–168, 1 set. 2022.

SANSALONI, C. et al. Diversity Arrays Technology (DART) and next-generation sequencing combined: genome-wide, high throughput, highly informative genotyping for molecular breeding of *Eucalyptus*. *BMC Proceedings*, v. 5, n. S7, p. P54, 13 dez. 2011.

WENDT, T. et al. An evaluation of the species boundaries of two putative taxonomic entities of *Euterpe* (Arecaceae) based on reproductive and morphological features. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, v. 206, n. 2, p. 144–150, fev. 2011.

Agradecimentos

O apoio financeiro a este estudo foi fornecido pelo Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, Brasil); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil)—Código de Financiamento 001, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES, Vitória—ES, Brasil), em parceria com a VALE e o Fundo Nacional de Biodiversidade - FUNBIO.