

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL CAMPUS LITORAL NORTE
CENTRO DE ESTUDOS COSTEIROS, LIMNOLÓGICOS E MARINHOS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BIOLOGIA MARINHA

Butiá de volta para o bolso: fenotipagem e identificação de genes regulatórios na produção de óleo
para biodiesel

Bruno Delatorre Salomon

Acadêmico do curso de Ciências Biológicas - Biologia Marinha

IMBÉ

2024

BRUNO DELATORRE SALOMON

Butiá de volta para o bolso: fenotipagem e identificação de genes regulatórios na produção de óleo para biodiesel

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para a
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas: ênfase em Biologia
Marinha e Costeira na Universidade
Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: Enéas Ricardo Konzen

IMBÉ

2024

BRUNO DELATORRE SALOMON

Butiá de volta para o bolso: fenotipagem e identificação de genes regulatórios na produção de óleo para biodiesel

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: ênfase em Biologia Marinha e Costeira na Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: Enéas Ricardo Konzen

Data de aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora

Rosa Lia Barbieri - Embrapa Clima Temperado

Gilson Schlindwein - Secretaria da Agricultura, Pecuária, Produção Sustentável e Irrigação do RS

CIP - Catalogação na Publicação

Salomon, Bruno Delatorre

Butiá de volta para o bolso: fenotipagem e identificação de genes regulatórios na produção de óleo para biodiesel / Bruno Delatorre Salomon. -- 2024.

33 f.

Orientador: Enéas Ricardo Konzen.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus Litoral Norte, Curso de Ciências Biológicas: Biologia Marinha e Costeira, Tramandai, BR-RS, 2024.

1. variabilidade de butia . 2. LEAFY COTYLEDON 1. 3. WRINKLED 1. 4. óleo. 5. biometria de pirênio. I. Konzen, Enéas Ricardo, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Resumo

Os butiazais têm sofrido severa erosão devido ao abandono e perda de habitat resultante dos avanços da atividade agrícola, pecuária e urbanização. A conservação e o plantio dos butiazeiros podem ser incentivados pela adição de valor econômico aos produtos que a mesma gera. Pirênios (endocarpo+semente) de butiá têm potencial para uso como matéria prima para biodiesel, mas há poucos estudos nessa direção. Este trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade de duas espécies de butiá, *Butia odorata* e *B. catarinensis*, no rendimento de óleo bruto e identificar genes relacionados à via de produção de óleo. Pirênios de ambas as espécies foram avaliados em quatro sítios de coleta: Laguna e Osório para *B. catarinensis*, e Palmares do Sul e Arambaré para *B. odorata*. Utilizando o método de Soxhlet para extração e determinação do teor de óleo em pirênios pesados em quantidade padronizada para cada progênie, identificou-se alta variabilidade no rendimento de óleo entre progênies. A variabilidade foi maior dentro das áreas (possíveis populações) de coleta do que entre elas, Laguna possui teores entre 17,34 a 40,17% e Palmares do Sul de 0% a 27,68% de óleo. Este trabalho é o primeiro que traz informação sobre a variabilidade desta característica entre butiazais. O estudo constatou variabilidade nas características biométricas avaliadas. O número de passagens pelo moedor para total moagem apresentou grande amplitude, para o uso industrial dos pirênios, a facilidade de moagem representa menor gasto energético e duração do procedimento. Os pirênios de Laguna são pequenos, e têm, em geral, alto rendimento de óleo, requerem menor esforço para moagem. Os pirênios de Palmares do Sul são maiores e produziram menos óleo, o que provavelmente está relacionado à alta predação que as plantas daquela área estão sujeitas. Utilizando bancos de dados públicos e o genoma de *Cocos nucifera*, desenharam-se primers para a amplificação dos genes *WRINKLED 1* e *LEAFY COTYLEDON 1*, que são conhecidos por regular a síntese de óleo em outras espécies, nas palmeiras matrizes que foram coletadas em cada área. Após amplificadas foram encaminhadas para sequenciamento e geração futura de marcadores genéticos. Este trabalho indica a possibilidade de seleção de genótipos de *Butia* como fontes sustentáveis de óleo para biodiesel, aumentando valor econômico e consequente conservação das espécies nativas do gênero *Butia*.

Palavras-chave: butiá. óleo. variabilidade. WRINKLED 1. LEAFY COTYLEDON 1. pirênio. biometria.

Abstract

Butia palm groves have suffered severe erosion due to abandonment and habitat loss resulting from advances in agriculture, livestock farming and urbanization. Conservation and cultivation of butia palms can be encouraged by adding economic value to their products. Pyrenes (endocarp + seed) of butia have potential for use as raw material for biodiesel, but there are few studies in this direction. This study aimed to evaluate the variability of two species of butia, *Butia odorata* and *B. catarinensis*, in crude oil yield and to identify genes related to the oil production pathway. Pyrenes of both species were evaluated in four collection sites: Laguna and Osório for *B. catarinensis*, and Palmares do Sul and Arambaré for *B. odorata*. Using the Soxhlet method for extraction and determination of oil content in weighted pyrenes in a standardized quantity for each progeny, high variability in oil yield was identified among progenies. Variability was greater within the collection areas (possible populations) than between them. Laguna has oil contents ranging from 17.34% to 40.17% and Palmares do Sul from 0% to 27.68%. This is the first study to provide information on the variability of this characteristic among groves. The study found variability in the biometric characteristics evaluated. The number of passes through the grinder for complete grinding showed a wide range. For industrial use of the pyrenes, the ease of grinding represents less energy expenditure and duration of the procedure. The pyrenes from Laguna are small and generally have a high oil yield, requiring less effort for grinding. The pyrenes from Palmares do Sul are larger and produced less oil, which is probably related to the high predation to which the plants in that area are subject. Using public databases and the *Cocos nucifera* genome, primers were designed to amplify the *WRINKLED 1* and *LEAFY COTYLEDON 1* genes, which are known to regulate oil synthesis in other species, in the palm tree stocks collected in each area. After amplification, they were sent for sequencing and future generation of genetic markers. This work indicates the possibility of selecting *Butia* genotypes as sustainable sources of oil for biodiesel, increasing economic value and consequently conserving native species of the *Butia* genus.

Keywords: butia. oil. variability. WRINKLED 1. LEAFY COTYLEDON 1. pyrene. biometrics.

Sumário

1	Introdução.....	7
2	Objetivos.....	9
2.1	Objetivo Geral.....	9
2.2	Objetivos Específicos.....	9
3	Justificativa.....	9
4	Material e Métodos.....	10
5	Resultados.....	13
6	Discussão.....	24
7	Considerações Finais.....	26
	Referências.....	27
	Apêndice.....	32

1. Introdução

Os butiazeiros são palmeiras que pertencem a espécies do gênero *Butia*, da família Arecaceae, ordem Arecales, classe Liliopsida das Angiospermas. O gênero *Butia* compreende 20 a 25 espécies, variando na literatura (Cídon 2023), e tem sua origem na América do Sul, ocorrendo no Sul do Brasil, no leste do Paraguai, nordeste da Argentina e noroeste e sudeste do Uruguai (Hoffmann et al. 2014). O butiazeiro tem importância ecológica, cultural e econômica no Brasil, sendo importante fonte de alimento para o ecossistema em que se encontra. Todas as suas partes, de folhas a fruto, podem ser utilizadas para produção artesanal (Tozetti et al. 2022). No entanto, estas espécies têm sido negligenciadas e sua diversidade genética está sob severa erosão (Nazareno e Dos Reis 2013; Mistura et al. 2016), devido à substituição dos butiazeiros por espécies agrícolas anuais, reflorestamento com espécies exóticas ou uso excessivo para pecuária e especulação imobiliária. Agregar uso e valor aos produtos de uma espécie é uma forma de estimular sua conservação e plantio (Sosinski et al. 2019), pois permite a obtenção de renda pelo produtor. A ampliação das fontes de alimento enfatizando as espécies Cinderella (Leakey 2012), e métodos de domesticação *de novo* são ótimas estratégias para assegurar produção sustentável, renda e alimento (Gepts 2023). Espécies Cinderella foram definidas por Leakey (2012) como árvores que apresetavam importância na alimentação e medicina de povos originais, mas que foram desconsideradas pela ciência.

Como uma medida buscando reduzir a dependência dos combustíveis fósseis, em 2008 houve a introdução compulsória do biodiesel na matriz de combustíveis no Brasil. O biodiesel tem sido reconhecido como uma alternativa renovável e verde ao diesel. Os teores iniciais de adição de biodiesel ao diesel eram de 2%, e se previa aumento deste para 15% em 2022. No entanto, devido ao custo elevado das matérias-primas, esse foi reduzido a 10% (BOLETIM DE BIOCOMBUSTÍVEIS E QUALIDADE DE PRODUTOS, 2022). No mundo, as principais matérias-primas para biodiesel são sementes de colza (*Brassica napus*) e girassol (*Helianthus annuus*) (EUA), soja (*Glycine max*) (Argentina, Brasil), óleo de palma (*Elaeis guineensis*) e *Jatropha* (Indonésia) (Mizik e Gyarmati 2021). A produção de biodiesel na Malásia e Indonésia permitiu melhorias na qualidade de vida e aumento de vagas de emprego (Dey et al. 2021). Nos últimos anos, na região centro norte o investimento em pesquisas para o uso da macaúba (*Acrocomia aculeata*) como “feedstock” tem aumentado e se espera melhoria na qualidade de vida das populações envolvidas com a cultura (Manir 2023). Coloca-se a perspectiva de que o mesmo possa ocorrer no Brasil nas áreas que possuem butiazeiros.

A principal restrição à comercialização do biodiesel é seu alto custo em comparação com o diesel, pois 70 a 95% do custo de produção advém do preço das matérias-primas (Ramos et al. 2019). Assim, a busca por outras fontes, especialmente subprodutos/descartes de outros processos produtivos é essencial. Conhecido popularmente como coquinho do butiá, o pirênio é subutilizado, sendo descartado ou usado artesanalmente na confecção de colares e pulseiras. O teor de óleo do coquinho, perfazendo até 57,8% de lipídios totais segundo estudo anterior (Faria et al. 2008), apresenta potencial alto para uso na produção tanto de biodiesel como de outros produtos à base de óleo, como biocombustíveis de aviação e bioquerosene. O butiá mostra promessa como “feedstock”, pois sua produção de oleato de metila, desejável para biodiesel, é proporcionalmente alta (20%) (Vieira et al. 2016). O butiá apresenta elevada produção de ácidos graxos saturados (Kobelnik et al. 2016). Óleos com alto teor de cadeias carbônicas saturadas são menos suscetíveis à oxidação, gerando um biodiesel mais estável (Prabhu et al. 2023), porém esses óleos se solidificam em temperaturas mais altas, o que pode gerar dificuldade na fluidez do biocombustível (Zuleta et al. 2012), podendo requerer misturas.

Existe variabilidade morfológica entre pirênios (endocarpo+semente), dentro do gênero *Butia* (Soares et al. 2014) e mesmo dentro de espécies, possuindo formas e tamanhos variados (Moura et al. 2010). Em outra espécie analisada para conteúdo de óleo, correlação positiva foi encontrada entre peso de semente e seu comprimento, espessura e conteúdo de óleo em pinhão-mansão (*Jatropha curcas*) (Kaushik et al. 2007). Em outras espécies oleaginosas, como a soja, foram encontrados resultados contrastantes, alguns positivos e outros negativos, em relação à correlação entre o tamanho da semente e o rendimento de óleo (Tinius et al. 1993; Marega Filho et al. 2001; Xu et al. 2022). A partir dessas

informações da literatura, considera-se importante utilizar medidas biométricas de pirênios para verificar a existência de correlação entre o tamanho do pirênio e a porcentagem de óleo extraída.

No gênero *Butia*, a regulação gênica da produção de ácidos graxos na semente ainda não é conhecida. Na planta modelo, *Arabidopsis thaliana*, a regulação é dependente do gene *WRINKLED1* (*WRI1*), que codifica um fator de transcrição da família AP2-EREBP (APETALA2-ethylene responsive element-binding protein) (Cernac e Benning 2004). *WRI1* liga-se às sequências promotoras de genes do final da rota glicolítica e da rota biossintética de ácidos graxos, atuando como amplificador da expressão (To et al. 2013). Por sua vez, *WRI1* tem sua expressão regulada por outros fatores de transcrição, como *LEC1* (LEAFY COTYLEDON 1) e *LEC2* (LEAFY COTYLEDON 2), *ABI3* (ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3) e *FUSCA3* (*FUS 3*), também conhecidos como reguladores mestres do processo de maturação (Baud e Lepiniec 2010). Esses últimos foram encontrados abundantemente na semente de palma (*Elaeis guineensis*), havendo alta expressão de *LEC1* no início da acumulação de óleo e de *ABI3* no seu final (Singh et al. 2013). A superexpressão de *WRI1* em diversas espécies levou ao aumento do conteúdo de óleo na semente, sugerindo que sua maior expressão seja essencial para garantir elevado teor de óleo (Sagun et al. 2023). O gene *CoWRI1*, de *Cocos nucifera*, espécie pertencente à mesma família que o butiá, quando superexpresso em *A. thaliana* e *Oryza sativa*, aumentou a expressão de genes relacionados à síntese de ácidos graxos e o conteúdo de lipídeos da semente destas espécies. Ressalta-se aumento do ácido palmítico (C16:0) em sementes transgênicas de ambas as espécies, porém em *Arabidopsis* houve também aumento do ácido esteárico (C18:0) e redução dos ácidos oleico (C18:1) e eicosanoico (C20:1), enquanto em arroz houve aumento do ácido linolênico (C18:3) e redução do oleico (C18:1) (Sun et al. 2017). Em *Cocos nucifera* não foram identificados genes alvos para *CoWRI1* (Sun et al. 2017), apesar deste ser capaz de interagir com genes de *Arabidopsis*.

Considerando que a regulação da rota da produção de óleo em *Butia* não foi ainda elucidada, é importante elucidar genes envolvidos no gênero. A identificação neste gênero de homólogos do gene *WRI1* e dos genes que codificam os fatores de transcrição que o regulam, ou dos genes com os quais interage, auxiliará no entendimento da regulação da rota empregada na síntese de ácidos graxos, e na avaliação se essa é similar a descrita em *A. thaliana*. Acessar a variação nucleotídica destes genes entre as espécies de butiá ou entre indivíduos de cada espécie, além de indicar variabilidade, pode ser utilizada para buscar correlações com a produção de óleo em futuros estudos de mapeamento associativo. Esse conhecimento pode futuramente auxiliar na seleção genética de genótipos mais adequados em empreendimentos de utilização de butiá para produção de biodiesel, além de avançar o conhecimento científico básico em espécies nativas.

Neste trabalho, duas espécies do gênero *Butia* presentes no Rio Grande do Sul foram objeto de estudo: *Butia odorata* e *B. catarinensis*. Ambas as espécies de *Butia* são plantas monoicas, protândricas e predominantemente alógamas, sendo diploides com $2n = 2x = 32$ cromossomos (Corrêa et al. 2009). *B. odorata* comumente possui estipe solitário e ereto com folhas pinadas, de coloração verde-acinzentada, bráctea peduncular lenhosa e lisa, flores amarelas, esverdeadas ou arroxeadas e frutos geralmente mais largos que compridos, com mesocarpo doce-acidulado e epicarpo de coloração amarela a laranja-avermelhado ou púrpura (Tozetti, Farina, e Raguse-Quadros 2022; Soares et al. 2014). *Butia catarinensis* e *B. odorata* foram até 2010 consideradas *B. capitata*, mas uma revisão taxonômica resultou nessa separação (Noblick 2014). Por sua vez, *B. catarinensis* é uma palmeira de estipe solitário de altura baixa (até dois metros, eventualmente 4m no máximo), diferenciando-se pelo porte de *B. odorata*, que atinge alturas até superiores a 10m. Ainda, estas espécies se diferenciam pelos frutos, que são menores e mais alongados e pelos endocarpos, que são oblongos ou estreito-ovóides em *B. catarinensis*, enquanto que no *B. odorata* são redondos ou, ligeiramente ovóides (Soares et al. 2014). A bráctea peduncular da inflorescência em *B. catarinensis* tem ápice apiculado, entretanto em *B. odorata* essa possui ápice agudo (Noblick 2014).

B. catarinensis ocorre no Rio Grande do Sul (RS) entre os municípios de Torres e Osório, crescendo nas restingas em solos arenosos e rochosos e campos litorâneos, e no litoral de Santa Catarina (SC). *B. odorata* ocorre no RS no litoral dos municípios Palmares do Sul, Viamão e Porto Alegre até o sudeste do Uruguai, crescendo em restingas (Soares et al. 2014). *B. odorata* é muito cultivada em pomares do centro e sul do RS, e mesmo mais ao sul no exterior, pois possuem adaptações importantes como tolerância ao frio (Noblick 2014). Contudo a expansão de terra de lavoura e pastagem tem limitado, ou mesmo dizimado o estabelecimento de butiazais, potencialmente conduzindo a uma perda de diversidade genética e de recursos para animais silvestres (Barbieri 2015).

Considerando tratar-se de espécies alógamas e não melhoradas e com relatos de cruzamentos férteis entre indivíduos das duas espécies, espera-se variabilidade alta entre indivíduos, possivelmente similar a variabilidade entre populações. Não há dados na literatura sobre a variabilidade na produção de óleo, os poucos estudos existentes com o gênero utilizaram frutos aleatórios sem identificação de butiazal de origem.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar a diversidade potencial em butiazeiro para produção de óleo e desenvolver marcadores moleculares associados a genes da via de produção do óleo.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar o grau de variação fenotípica para conteúdo de óleo de pirênios de butiazais das espécies *Butia odorata* e *Butia catarinensis*;
- Verificar se variáveis biométricas de pirênios de butiás se correlacionam com o conteúdo de óleo;
- Identificar se há predação por larvas nos pirênios, se é similar entre locais de coleta e seu impacto no rendimento de óleo;
- Identificar genes ortólogos aos da via de biossíntese do óleo em butiás e desenvolver marcadores moleculares para sua amplificação.

3. Justificativa

A importância desse trabalho pode ser justificada de várias maneiras. Primeiramente, se associa aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização de Nações Unidas (ONU), particularmente aos ODS oito, 12 e 15 que estipulam, respectivamente: crescimento econômico inclusivo e sustentável; padrões de consumo e produção sustentáveis; e proteção, restauração e uso sustentável dos ecossistemas terrestres e reversão da degradação de habitats e perda de biodiversidade.

O estudo sobre os genes envolvidos na regulação da produção de óleos nas espécies de butiás, com perspectiva de viabilizar o uso do coquinho para o biodiesel encaixa-se nos três ODS citados, pois produz conhecimento sobre a diversidade genética de butiás, aumentando o conhecimento relativo à presença e expressão de genes ortólogos aqueles de espécies modelos. Gerando, portanto, base para futuramente agregar novo valor monetário à espécie, podendo levar a maior área de preservação e recuperação. A realização de futuros projetos de melhoramento, baseados nesse conhecimento inicial, deve permitir o desenvolvimento de genótipos para produção em grande escala.

O oferecimento de fontes alternativas para a produção de biodiesel, tanto em termos de qualidade de óleos produzidos, quanto de uso de subproduto de outra atividade, pode reduzir o custo da produção deste, uma vez que o custo da matéria-prima é o maior atual limitador da produção de

biodiesel. O óleo produzido por butiás pode ser uma fonte importante de energia considerada verde para substituir derivados de petróleo na indústria de transportes.

Naturalmente, cabe também mencionar a importância dos butiás nos ecossistemas, servindo de alimento para ampla gama de espécies que utilizam não só o fruto, mas também o coquinho. A ampliação do conhecimento básico sobre essas espécies gera a perspectiva de incremento de uso com aumento de renda e consequente da maior preservação das mesmas.

4. Material e métodos

4.1. Material vegetal

O material vegetal (frutos de butiazeiros) foi coletado em butiazais localizados em Laguna (SC) e Osório (RS) para a espécie *Butia catarinensis*, e em Arambaré (RS) e Palmares do Sul (RS) para a espécie *Butia odorata*, (Figura 1). Cada planta amostrada (indivíduo) foi referenciada com o uso de GPS (Apêndice 1). No total foram amostradas 23 palmeiras reprodutivas, que constituíram amostras de 23 progênes. Um cacho de cada planta foi cortado e etiquetado para transporte, posteriormente os pirênios foram removidos manualmente ou por meio de jato de água. Os pirênios foram secos em temperatura ambiente e armazenados a 10°C.

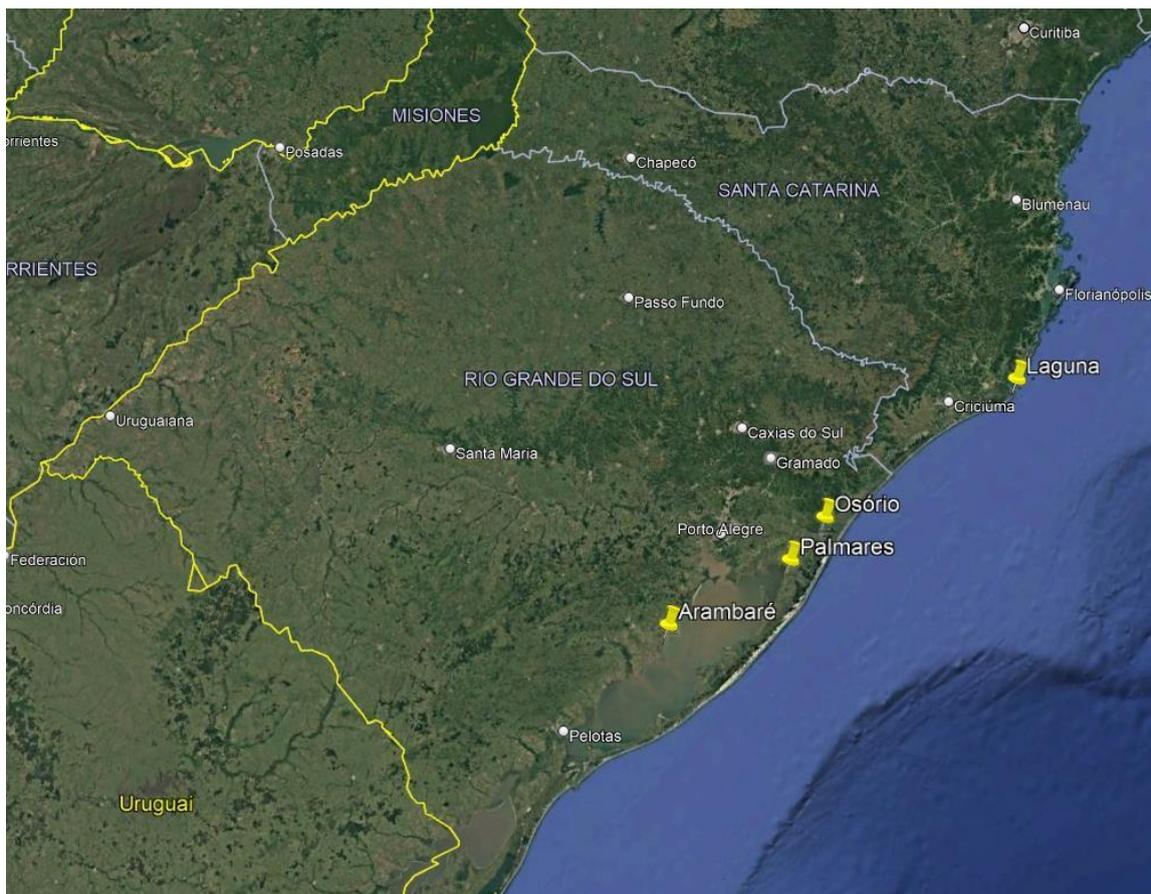


Figura 1: Mapa demonstrativo dos locais de coleta dos pirênios. Os pinos amarelos indicam a posição aproximada de cada local.

4.2. Extração e quantificação de óleo de pirênios

Os pirênios de cada planta foram reunidos em amostras padronizadas com 30g, pesadas em balança digital de precisão. O número de pirênios por amostra foi contado e registrado como variável neste estudo. As amostras foram moídas em moedor de impacto (DeLeo). A moagem se deu em passadas de 5 min para evitar sobreaquecimento do moinho. O número de passadas necessário para a moagem completa foi registrado. Amostras de 6g de farinha foram secas em estufa a 105°C overnight, destas foram retiradas duas amostras de 2g por planta (replicatas técnicas) e empacotadas em papel filtro. A extração de óleo (gordura bruta, GB) foi realizada utilizando o Aparelho de Soxhlet, conforme Prates (2007). A amostra foi adicionada à câmara com sifão, adicionando-se 40 ml de éter anidro aos balões de Soxhlet, os sifões conectados aos balões e ao destilador. A temperatura das placas de aquecimento foi ajustada para 60°C e a extração ocorreu por 8 h. O óleo extraído foi pesado após secagem em temperatura de 60°C e após secagem a 105°C por 2 h (Figura 2). Foi utilizada a seguinte razão de proporção para quantificação do óleo: % GB na MS = [(Peso final do balão- peso inicial)/ peso da amostra] x 100. A diferença no cálculo entre 60 e 105°C foi usada para calcular a umidade de cada amostra. A média das duas replicatas técnicas foi utilizada como valor de cada butiazeiro (indivíduo). A quantidade de óleo por progênie de cada local foi analisada usando gráfico de boxplot, análise de variância e análise de médias Tukey ($p= 0,05$ e $0,1$).

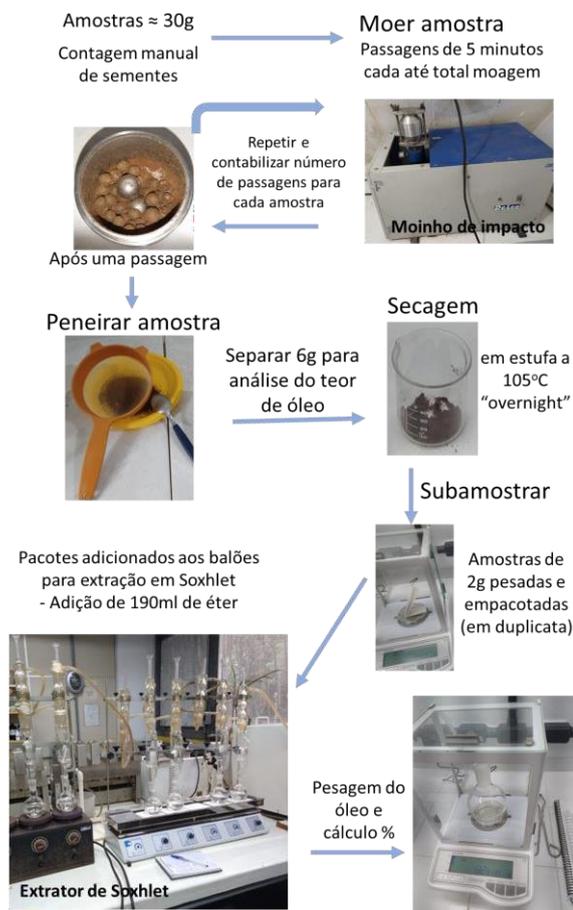


Figura 2. Fluxograma do processo de quantificação de óleo de pirênios de butiá.

4.3. Análises de variáveis biológicas e biométricas

Utilizando balança de precisão, realizou-se a contagem do número de pirênios necessários, por progênie, para se alcançar 30 g. Destes, 6 g foram usados para extrair o óleo e o restante para refazer a extração no caso de erros ou falhas na extração. Assim, indiretamente foi avaliado o peso médio dos pirênios de cada planta. Nesses pirênios foi avaliada a ocorrência de predação pela observação da presença de furos de saída da larva de besouro que teria consumido uma ou mais amêndoas do pirênio.

Como indicado no item “extração e quantificação de óleo de pirênios”, o passo final antes da extração de óleo é a moagem das amostras de 30g por uso de moedor de impacto, para evitar sobreaquecimento do motor desse e para observar a resistência do pirênio à quebra, as amostras foram moídas em passagens de 5min e o número de passagens necessárias para moer todos os coquinhos da amostra foi anotado, por servir como indicação da dureza do endocarpo e de possíveis diferenças entre indivíduos na característica do tecido.

O programa Smartgrain (Tanabata et al. 2012) foi utilizado para calcular a área, o perímetro, o comprimento, a largura, a circularidade e a distância do centro a borda dos pirênios, para cada um dos indivíduos. Foram utilizados 40 pirênios por indivíduo, exceto por indivíduos com número máximo inferior de pirênios.

As variáveis número de pirênios para 30g, predação e número de passagens foram utilizados para produzir gráficos de boxplot para melhor compreender a variação entre progênies e entre locais de coleta. Todos esses dados foram analisados utilizando R (R CORE TEAM, 2024) com o pacote *corrplot* (Taiyun Wei et al. 2024) para avaliar a correlação entre estes e o conteúdo de óleo e produzir um correlograma. Os dados biométricos foram analisados utilizando um gráfico de violino produzido no R com o pacote *ggplot2* (Wickham 2011).

4.4. Análises in silico para busca de genes da via dos ácidos graxos

Sequências de diferentes espécies depositadas em bancos de dados de sequências de nucleotídeos, TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>), NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Palm Comparomics Hub (<https://palm-genome-hub.southgreen.fr/>) (Yang et al. 2021), com similaridade aos genes de *Arabidopsis thaliana*, *WRI1*, *LEC1*, *LEC2*, *ABI3* e *FUSCA3* foram buscadas e alinhadas usando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor com o algoritmo de múltiplo alinhamento do ClustalW.

Uma árvore filogenética foi desenvolvida utilizando o programa MEGA (Kumar et al. 2018) pelo método de máxima verossimilhança seguido de teste de reamostragem bootstrap com 500 repetições para os genes *WRI1* e *LEC1*.

Regiões de íntrons e exons foram identificadas para o gene *WRI1* utilizando a sequência completa de DNA e a de cDNA de *Cocos nucifera* oriunda do Palm Comparomics Hub no programa Gene Structure Display Server (GSDS) (Hu et al. 2015).

4.5. Extração de DNA, desenho, teste de primers e reações para sequenciamento

O DNA foi extraído de tecido foliar das vinte e três plantas pelo método CTAB modificado (Doyle e Doyle 1990) e a qualidade foi aferida por espectrofotometria (razão A260/A280 em Nanodrop Thermo Scientific) e gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

O desenho de pares de primers específicos para amplificação e posterior sequenciamento da região codificante dos genes em *Butia catarinensis* e *B. odorata* foi realizado utilizando a sequência

completa de DNA COCNU_HT001RO01_04 de Palm Comparomics Hub para *WRII* e a sequência VOII01000330.1:90159-90437 do NCBI para *LECI*. O programa BioEdit Sequence Alignment Editor foi utilizado, sendo os primers desenhados manualmente, e suas propriedades analisadas no programa Netprimer (<https://www.premierbiosoft.com/netprimer/>), incluindo suas temperaturas de *melting* e estrutura secundária. Foram desenhados primers de forma a obter fragmentos que permitissem a cobertura de toda a extensão da região codificante de cada gene.

Para testar os primers, foram preparadas reações de PCR em 25 µL contendo 1x tampão para PCR (20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl), 1,6 mM MgCl₂, 0,12 mM dNTP, 0,2 µM de cada par de primer e 1 U de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotecnologia). As condições de amplificação foram avaliadas, inicialmente, via gradiente de temperaturas de pareamento, da seguinte forma: desnaturação inicial a 94°C por 2 min; 38 ciclos a 94°C por 30 s (desnaturação), Gradiente: 64,3°C, 63°C, 61,1°C, 58,8°C, 56,9°C, 55,7°C por 30 s (pareamento com primers), e 72°C por 45 s (extensão de fragmentos); e extensão final a 72°C por 7 min

As seguintes condições foram utilizadas para a amplificação para todos os primers de *WRII* e *LECI*: desnaturação inicial a 94°C por 2 min; 40 ciclos a 94°C por 30 s, 59°C por 30 s, e 72°C por 45 s; e extensão final a 72°C por 7 min.

Os fragmentos foram analisados em 100 mL gel de agarose 1,2% contendo 4 µL de brometo de etídeo, onde adicionou-se 5 µL do produto final de cada reação adicionado de 2 µL de tampão de carregamento (azul de bromofenol + xilenocianol + glicerina bidestilada 20%), para comparação de tamanho foi adicionado 4 µL do ladder 100 kb (Ludwig Biotecnologia). A eletroforese ocorreu em 80 volts em tampão TBE 1X. Após a eletroforese, os géis foram imediatamente fotografados utilizando transiluminador Loccus para verificar a presença de amplicon (banda) e seu tamanho.

Os primers que permitiram a amplificação de banda única por indivíduo foram utilizados para análise de todos os indivíduos. Para os indivíduos em que houve amplificação, o restante da reação foi transferido para novos tubos e armazenados a baixa temperatura, posteriormente estes foram enviados para sequenciamento em empresa terceirizada.

5. Resultados

5.1 Variação no teor de óleo

Os teores de óleo dos pirênios de cada áreas são apresentados após secagem a 60°C e 105°C (Figura 3), permitindo calcular a umidade. Os valores obtidos após secagem completa, considerando 100% de massa seca, são também detalhados. O teor de óleo encontrado variou entre as áreas e dentro delas (Figura 2). A maior variação entre áreas ocorreu entre Laguna e Palmares do Sul, onde as medianas foram 30,05% e 8,33%, respectivamente e as médias foram 29,15 % e 11,09%, respectivamente. A mediana e as médias dos teores encontrados em Arambaré (21,86% e 23,19%) e Osório (28,97% e 28,52%) se assemelham mais às obtidas em Laguna. A espécie avaliada em Laguna e Osório foi *Butia catarinensis*, enquanto em Arambaré e Palmares do Sul foi *Butia odorata*, considerando que somente uma ou outra ocorrem naturalmente nas respectivas áreas.

A maior variação dentro de uma área ocorreu em Palmares do Sul, onde a amplitude interquartil foi de 22,95%, seguida por Laguna com 21,69%. Nos demais locais a amplitude interquartil foi menos da metade, obtendo-se 8,57% em Osório e 9,08% em Arambaré (Figura 2). Apesar de similar valor de interquartil, a amplitude total entre os teores de óleo obtidos em Osório foi muito menor (22,96% a 33,17%) do que a em Arambaré (15,75% a 33,73%). Laguna possui teores entre 17,34 a 40,17% e Palmares do Sul de 0% a 27,68% de óleo. O valor mínimo (zero) obtido em Palmares do Sul refere-se a um indivíduo no qual todos os pirênios sofreram predação, se desconsiderado esse indivíduo, o menor teor de óleo nos indivíduos dessa área é 3,96%. A variação dentro de áreas, de modo geral, foi maior que a variação entre áreas, que não apresentou diferença significativa.

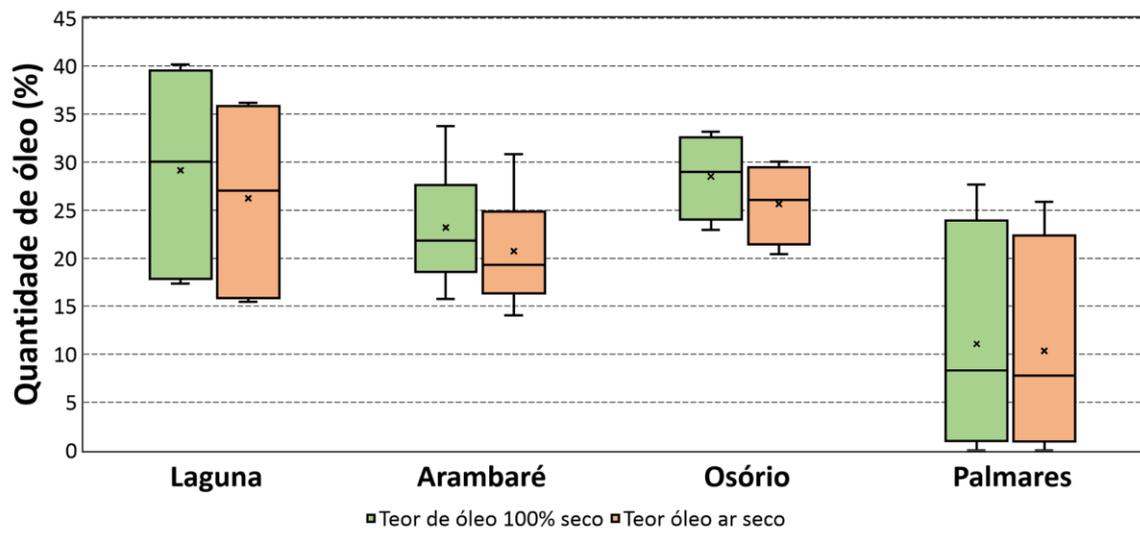


Figura 3. Boxplot da produção de óleo de pirênios das espécies *Butia odorata* (Arambaré e Palmares do Sul) e *Butia catarinensis* (Laguna e Osório) expresso 100% seco (105°C) e seco ar (60°C). CV=29% (n= 4 a 8 butiazeiros), por ANOVA não houve diferença entre as médias das áreas.

5.2 Variáveis biológicas e biométricas dos pirênios

Observou-se que para completar a amostra de 30g de pirênios houve grande variação no número de pirênios necessários entre os butiazeiros avaliados (20 a 88), o que indica diferença no peso individual de pirênios (0,34 a 1,50g). Os dados de número de pirênios necessários para se alcançar 30g é apresentado por locais de coleta (Figura 4A), onde Palmares do Sul apresentou a menor mediana com 28 pirênios e Laguna a maior com 51,50. Um indivíduo de Laguna foi estatisticamente considerado um outlier, seu peso médio de pirênio foi de 0,34g, enquanto que o peso médio dos pirênios do local foi 0,59g. Laguna e Osório apresentaram assimetria positiva. As medianas de Arambaré e Osório foram 43 e 37,5 pirênios, respectivamente. As médias de Arambaré (43) e Osório (45) se assemelham mais à obtida em Laguna (57,17) do que a de Palmares do Sul (27,25 pirênios). Laguna, butiazal de *B. catarinensis*, se diferenciou de Palmares do Sul, *B. odorata* ($p=0,05$), no entanto Arambaré e Osório não se diferenciam destes. Em *B. Odorata*, nos locais de coleta Arambaré e Palmares do Sul foi constatada maior simetria e menor amplitude interquartil, sendo Arambaré (38 a 48,5) e Palmares do Sul (22 a 31,75), Já os números mínimos e máximos de pirênios de Arambaré (24 e 62) demonstram que a variação desse local de coleta foi muito maior do que a de Palmares do Sul (20 e 33), indicando uma maior variação de peso entre os pirênios dos indivíduos de Arambaré (0,48 a 1,25g). Em *B. catarinensis*, Osório apresentou a maior variação de peso de pirênios, requerendo o mínimo de 27 (indivíduo com peso médio de pirênio de 1,11g) e máximo de 78 pirênios (indivíduo com peso médio de pirênio de 0,38g) para compor a amostra de 30g, possuindo a maior amplitude interquartil (27,75 a 69,75) sendo o local de coleta de maior dispersão (Figura 4A).

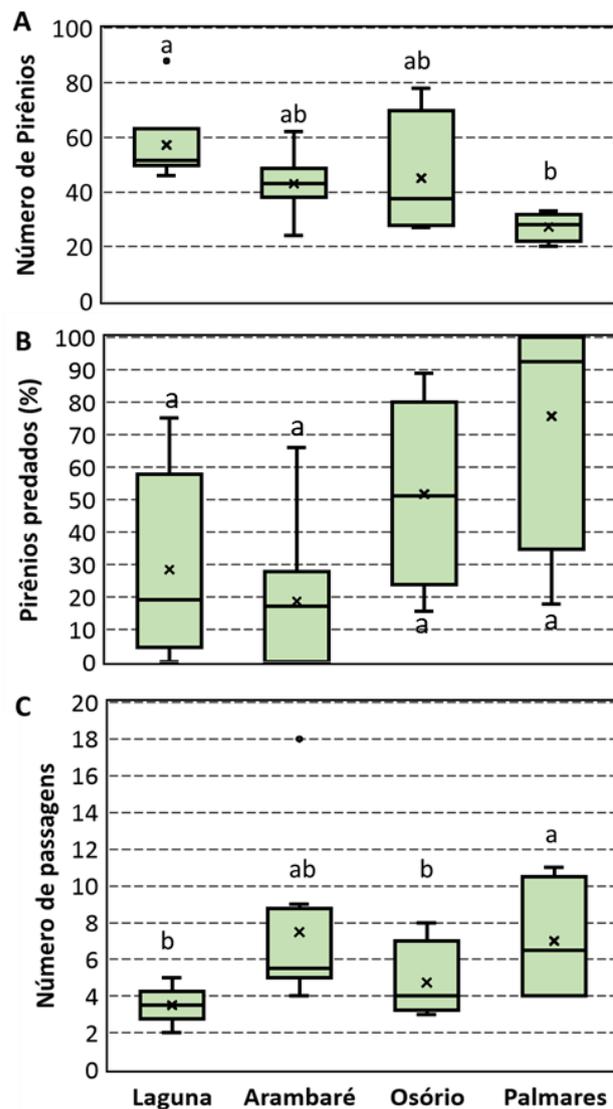


Figura 4. Características dos pirênios das espécies *Butia odorata* (Arambaré e Palmares do Sul) e *Butia catarinensis* (Laguna e Osório) utilizados para extração de óleo. (A) Boxplot do número de pirênios necessários para completar 30g de amostra, CV= 33%; (B) Boxplot da predação de pirênios (%), CV=115%; (C) Boxplot do número de passagens de 5 min pelo moinho de impacto para total moagem dos pirênios, CV=54%. (n= 4 a 8 butiazeiros). Letras diferentes indicam diferença estatística por teste de Tukey ($p=0,05$).

Observou-se predação nos pirênios em todos os locais de coleta. Hipotetizou-se que a predação poderia reduzir a quantidade de óleo dos pirênios, portanto se decidiu quantificar a predação das amostras. A predação foi avaliada em porcentagem do número de pirênios amostrados que foi predada (Figura 4B). Houve grande dispersão em todos os locais e o coeficiente de variação foi extremamente alto. Palmares do Sul apresentou a maior porcentagem numérica de predação, com amostras de dois indivíduos com 100% de predação e média de predação no local de coleta de 75,7% e mediana de 92,42%, indicando assimetria negativa e maior tendência à predação apesar da grande dispersão. A menor média de porcentagem de predação ocorreu em Arambaré com 18,7%. Os locais de coleta Laguna (*B. catarinensis*) e Arambaré (*B. odorata*) apresentaram, ambos, amostras onde nenhum pirênio tinha sinais de predação, contudo a porcentagem máxima de ambos os locais foi relativamente alta, com amostras com 75% e 66% de pirênios predados, respectivamente. Arambaré apresentou a menor amplitude interquartil de 0% a 27,72% (Figura 4B).

A facilidade para pulverizar completamente a amostra de pirênios pode ser um fator importante

na indústria, pelo tempo necessário, pela energia consumida e, conseqüentemente, podendo impactar no custo do processo. O número necessário de passagens pelo moedor de impacto dá uma estimativa desta característica e é apresentado na Figura 4C. O número de passagens variou de duas a 18. Os indivíduos de Laguna e Osório apresentaram, em geral, pirênios com maior facilidade de moagem que os de Palmares do Sul ($p=0,05$), havendo menor dispersão que nos demais locais e distribuição simétrica e unimodal, pois a mediana e a média coincidem em 3,5 passagens de 5 min pelo moedor para total moagem. A maior mediana foi obtida em Palmares do Sul (6,5), onde houve maior dispersão, indicada pela amplitude interquartil (4 a 10,5 passagens), sugerindo maior diversidade na característica de resistência à moagem. A maior média foi obtida com os indivíduos de Arambaré (7,5 passagens), salienta-se o maior distanciamento da mediana (5,5), indicando que os valores no topo da distribuição estão mais distantes do centro da amostra, ou seja, alguns indivíduos apresentam resistência bem mais elevada que a tendência no local. Neste local de coleta, um indivíduo foi considerado outlier, requerendo 18 passagens no moedor de impacto. Em Osório também se obteve assimetria positiva, com tendência a maior facilidade de moagem, porém com maior dispersão que em Laguna (Figura 4C).

O formato dos pirênios variou consideravelmente entre locais de coleta. Os pirênios da espécie *Butia catarinensis* são frequentemente ovóides, enquanto aqueles de *B. odorata* são mais arredondados, pelo menos nas progênies avaliadas (Figura 5A). A variação total das áreas dos pirênios foi extremamente alta (10,56 mm² a 261,85 mm²), como pode ser visualizado nas Figuras 5A e 5B. Laguna apresentou vários outliers que, mesmo diferenciando-se da tendência populacional, podem ter sido excluídos da análise devido ao método de cálculo do boxplot ou mesmo pelo número de amostras (Figura 5B). Laguna demonstrou o maior número de outliers de pequena área e foi o único a apresentar assimetria negativa, sugerindo tendência a pirênios com menor área. Ignorando outliers, Palmares do Sul demonstrou a maior amplitude (88,16 mm² a 261,85 mm²), com intervalo interquartil com tamanho superior aos dos locais de coleta restante.

Para entender melhor a dispersão da área, analisou-se o comportamento dentro dos indivíduos de cada local (Figura 5C). A dispersão da área de pirênios não foi homogênea entre indivíduos dentro de locais, ou seja, alguns butiazeiros possuíam pirênios com pouca variação de tamanho, enquanto outros apresentavam grande variação, vide Laguna 09 e Laguna 13, ou Osório 14 e Osório 17, como exemplo. O comportamento individual observado demonstrou que os pirênios de Arambaré tinham média próxima a média geral dos locais de coleta, enquanto que em Laguna a maioria dos indivíduos apresentou média abaixo da média geral dos locais. Um indivíduo em específico de Laguna (Laguna 13) apresentou áreas muito pequenas e pouca dispersão entre pirênios do indivíduo, o que não foi normal para o restante dos indivíduos tanto de Laguna como dos outros locais de coleta que apresentavam uma dispersão maior nos valores de área entre os pirênios dentro de um indivíduo (pirênios de um mesmo cacho). As médias de todos os indivíduos de Palmares do Sul se encontram acima da média geral dos locais (Figura 5C).

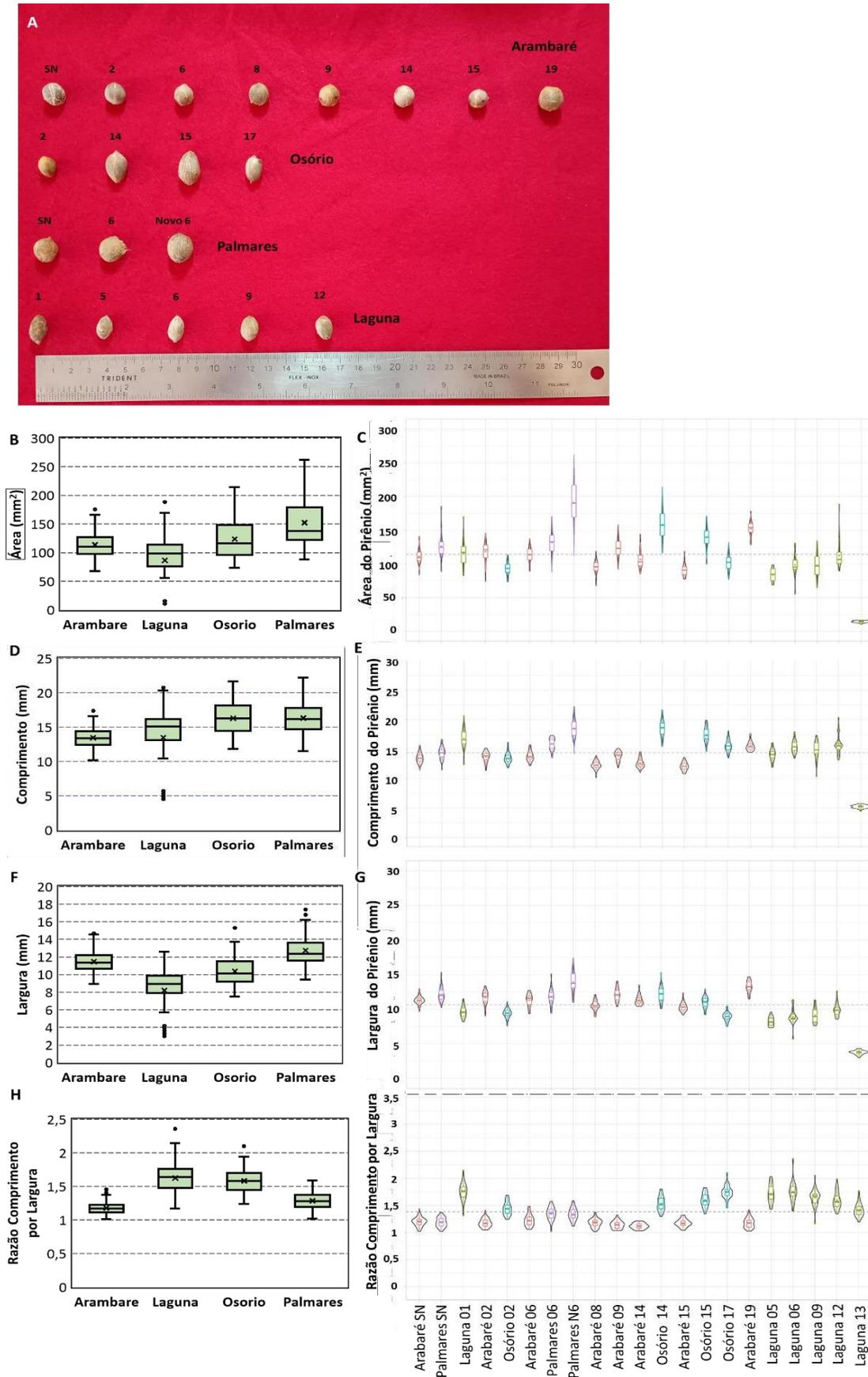


Figura 5. Biometria dos pirênios das espécies *Butia odorata* (Arambaré e Palmares do Sul) e *Butia catarinensis* (Laguna e Osório). (A) Pirênios dos diversos locais de coleta. O número acima do pirênio indica o butiazeiro de origem; (B, C) área (mm²); (D, E) comprimento (mm); (F, G) largura (mm); (H, I) razão entre comprimento e largura dos pirênios. (B, D, F, H) boxplot da média dos butiazeiros dos locais de coleta (n= 4 a 8 butiazeiros); (C, E, G, I) Gráfico de violino dos pirênios de cada butiazeiro (amostra= 21 a 50 pirênios). A linha pontilhada indica a média geral de cada característica dos pirênios. Letras e números que seguem o nome do local identificam a planta.

Foi comparado também o comprimento, a largura, o perímetro e a distância do centro ao ápice. A área, de modo geral, foi a característica com maior variação dentro de cada progênie. A variação do comprimento dos pirênios, de modo geral, foi simétrica, à exceção dos pirênios coletados em Laguna, em que houve assimetria negativa, indicando tendência central da amostra para pirênios mais longos (Figura 5D). Vários butiazeiros de Laguna foram considerados outliers. Apesar da diferença de formato dos pirênios, as médias do comprimento foram similares entre Osório (16,28 mm) e Palmares do Sul (16,27 mm), e entre Arambaré (13,71 mm) e Laguna (13,44). Arambaré teve a menor amplitude interquartil, indicando comprimentos menores. O comprimento médio geral foi 15 mm (Figura 5E). Quando analisada a variação dentro de cada butiazeiro, novamente destacou-se Laguna 13, que apresentou os pirênios mais curtos e mais homogêneos (menor amplitude). Interessantemente, outros indivíduos de Laguna tiveram elevada amplitude, como Laguna 01 e Laguna 09. A exceção de Arambaré 19, todos os demais indivíduos do local apresentaram média e mediana do comprimento inferior à média geral, o oposto ocorreu em Osório, onde apenas Osório 02 teve média do comprimento de pirênios inferior à média geral (Figura 5E).

Os butiazais de *B. catarinensis* apresentaram as menores larguras (Figura 5F). A largura dos pirênios foi menor numericamente para Laguna (8,25 mm), seguida por Osório (10,36 mm), Arambaré (11,5 mm) e por fim Palmares do Sul (12,63 mm). Butiazeiros foram identificados como outliers em Laguna, com menor largura, e em Osório e Palmares do Sul, com maior largura. Arambaré apresentou distribuição simétrica, enquanto em Laguna esta foi assimétrica negativa e nos demais locais levemente assimétrica positiva. A média geral de largura foi 10,67 mm. Quando analisada a variação dentro de cada butiazeiro (Figura 5G), observou-se que todas as médias e medianas de largura dos pirênios de Laguna ficaram abaixo da média geral, enquanto todos de Palmares do Sul ficaram acima. Laguna 13 também apresentou as menores larguras, sendo um pirênio menor que os demais em ambas as dimensões. A amplitude foi bastante variável entre plantas, como pode ser observado pelos diferentes formatos dos violinos. De modo geral, maior amplitude na largura foi encontrada dentro dos butiazeiros de Palmares do Sul (Figura 5G).

Como o formato do pirênio relaciona-se a relação entre as dimensões comprimento e largura, a razão entre estas grandezas foi calculada (Figura 5H). Valores próximos a 1 indicam formato mais circular, enquanto valores superiores indicam alongamento da forma. Os pirênios da espécie *B. odorata* obtiveram valores mais próximos de um que os de *B. catarinensis*. Em todos os locais a mediana se mostrou muito próxima da média. A menor amplitude interquartil foi encontrada para Arambaré, porém algumas plantas foram consideradas outliers. Laguna apresentou a maior amplitude (Figura 5H). Ao avaliar a variabilidade dentro de cada indivíduo, observou-se que todos os butiazeiros de Laguna e Osório tiveram média e mediana acima da média geral (1,4), mas Laguna apresentou maiores amplitudes que os butiazeiros de outros locais (Figura 5I). Alguns pirênios de todos os indivíduos de Laguna tiveram a razão igual ou superior a 2, a exceção de Laguna 13, que se mostrou mais arredondado, similar a Osório 02. As menores médias e medianas foram obtidas pelos pirênios dos butiazeiros de Arambaré (Figura 5I).

O perímetro dos pirênios foi estimado matematicamente. A média geral foi de 44mm. Laguna apresentou a menor média numérica (39mm) e Palmares do Sul a maior (50mm) (Figura 6A). No entanto, as medianas de Laguna e Arambaré tiveram valor similar, da mesma forma que as medianas de Osório e Palmares do Sul. A distribuição dos dados de Laguna mostrou-se assimétrica negativa. A dispersão foi similar entre Laguna, Osório e Palmares do Sul, contudo os valores superiores de Palmares do Sul alcançaram 67mm de perímetro e Laguna alcançou 56mm. Ao analisar o perímetro dos pirênios em cada progênie, observa-se maior dispersão em indivíduos de Laguna e Palmares do Sul (Figura 6B). Como esperado, Laguna 13 apresentou a menor dispersão e menor perímetro médio de pirênio entre todas as plantas analisadas. Palmares N6 apresentou a maior média e mediana, contudo, também uma grande dispersão com assimetria positiva.

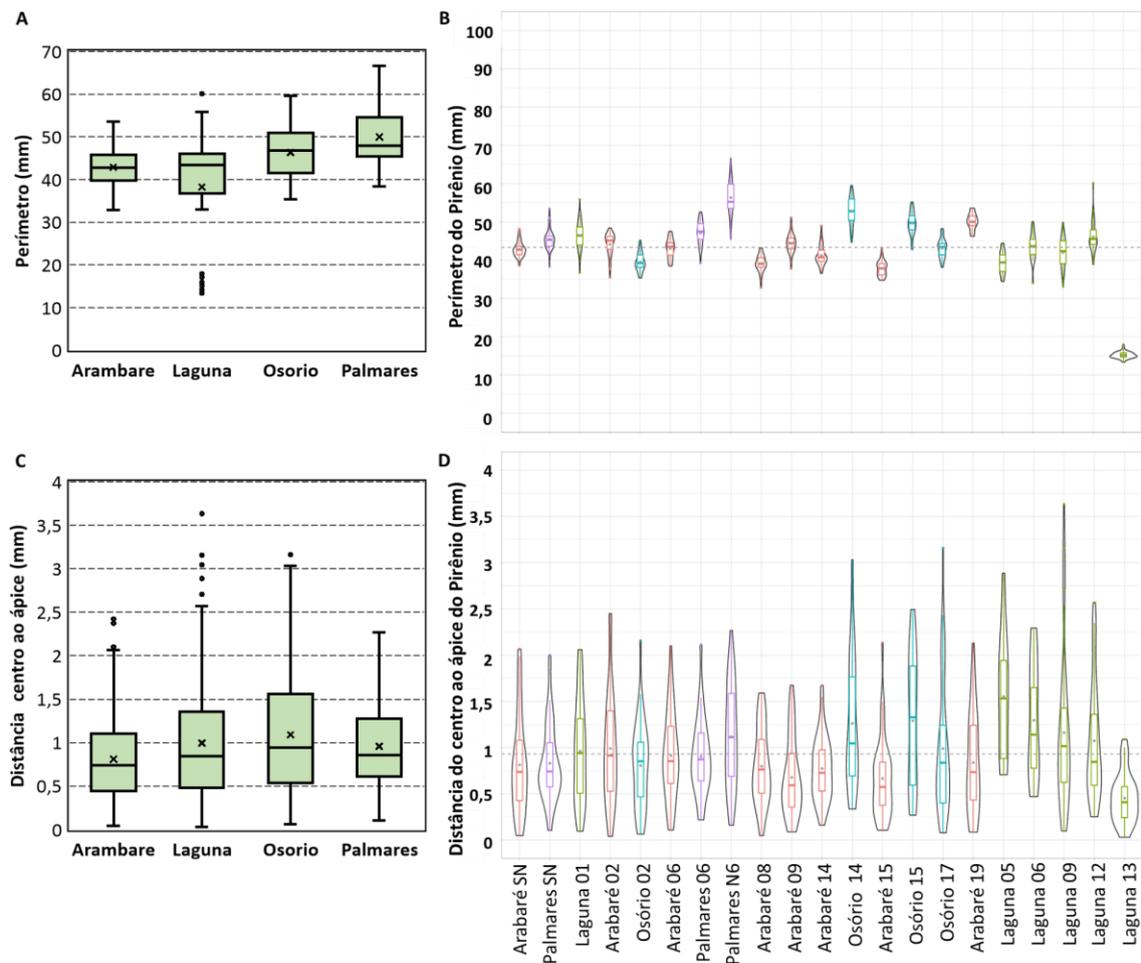


Figura 6. Perímetro (mm) (A, B) e Distância do centro ao ápice (mm) (C, D) dos pirênios das espécies *Butia odorata* (Arambaré e Palmares do Sul) e *Butia catarinensis* (Laguna e Osório). (A, C) boxplot da média dos butiazeiros dos locais de coleta (n= 4 a 8 butiazeiros); (B, D) Gráfico de violino dos pirênios de cada butiazeiro (amostra= 21 a 50 pirênios). A linha pontilhada indica a média geral do perímetro dos pirênios. Letras e números que seguem o nome do local identificam a planta.

A distância do centro ao ápice dos pirênios foi similar entre os locais de coleta, apresentando média geral de 0,98mm. As médias variaram de 0,81 em Arambaré a 1,09 em Osório. A distribuição dos dados em todos os locais apresentou uma leve assimetria positiva. A avaliação da distribuição das características em cada progênie demonstrou comportamentos bastante diferenciados entre os butiazeiros (Figura 6C e 6D).

5.3 Correlação das variáveis

A análise de correlação entre as características avaliadas é apresentada na Figura 7. Das variáveis biométricas medidas, foi criado um correlograma apenas considerando a área de pirênios, pois já se verificou anteriormente que há uma alta correlação positiva (próxima de 1,0) entre área, perímetro, comprimento e largura de frutos/pirênios. O correlograma apresentou correlação positiva de 0,43 entre área do pirênio e predação, possivelmente apontando que butiazeiros que produzem pirênios maiores podem ser mais atrativos para o besouro, e de 0,32 entre área do pirênio e número de passagens, sugerindo pirênios maiores serem mais duros/resistentes que pequenos, mas não houve correlação entre número de passagens e percentual de predação. O número de pirênios necessários para completar 30 g e a área destes tiveram correlação negativa de 0,61, o que era esperado pelo fato de que quanto mais pirênios são necessários para alcançar o peso menor/mais leves estes seriam. O número de pirênios também apresentou correlação de 0,38 com o número de passagens, apontando que pirênios maiores/mais pesados podem ser mais resistentes. O conteúdo de óleo apresentou correlação negativa com percentual de predação (0,42), o que significa que a predação pode ter levado ao consumo de massa das amêndoas. A análise também mostrou relação negativa do conteúdo de óleo com o número de passagens (0,34) e com a área individual dos pirênios (0,25).

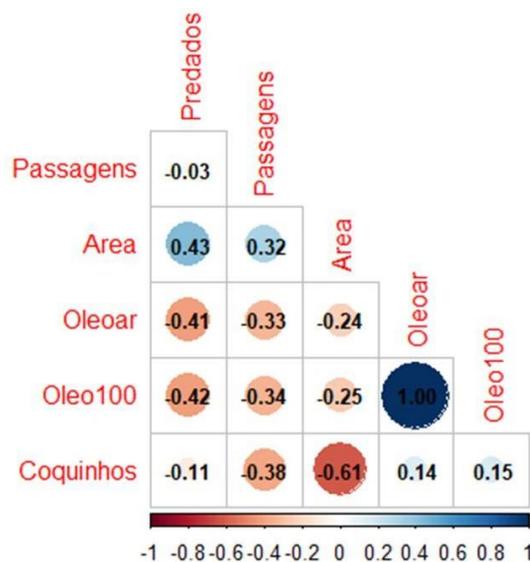


Figura 7. Correlograma das características avaliadas em pirênios de butiá das espécies *Butia odorata* e *Butia catarinensis* de todos os locais de coleta. Coquinhos = Número de pirênios em 30 g.

5.4 Análises in silico e filogenias

Para os genes *LEC2*, *ABI3* e *FUSCA3* foram realizadas comparações entre sequências de diversas espécies, porém não foi obtida informação em *Cocos nucifera* ou outra *Arecaceae*. Devido a maior dificuldade de alinhamento, optou-se por concentrar esforços nos genes *WR11* e *LEC1*, em que sequências estavam disponíveis.

As árvores filogenéticas (Figura 8) produzidas demonstram que as sequências de *WR11* e *LEC1* não diferenciam muito entre espécies, não formando clusters separados entre mono e dicotiledôneas, sugerindo que os primers obtidos delas teriam boa chance de serem efetivos na ampliação dos genes nas espécies de *Butia*, considerando a baixa variação nucleotídica mesmo entre espécies mais distantes.

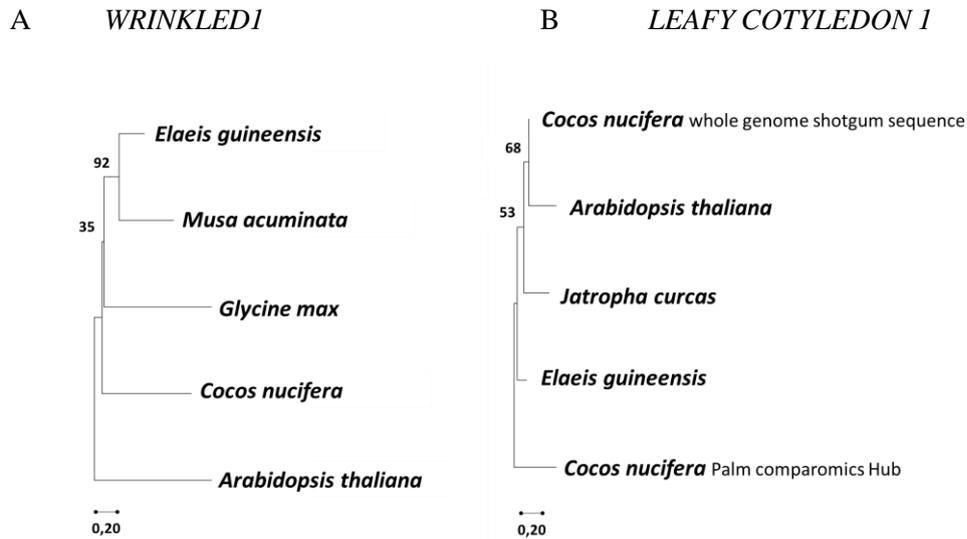


Figura 8: Árvores filogenéticas de sequências de *WRINKLED1* (A) e *LEAFY COTYLEDON 1* (B)

Foi possível analisar e diferenciar éxons e íntrons da sequência de *WRINKLED 1* (Figura 9) de *Cocos nucifera* sendo identificados sete éxons e seis íntrons, usados como base para desenhar os seus primers. O mesmo não foi possível para *LECI* por falta de informação do mRNA de *LECI* nos bancos de dados utilizados, neste caso o alinhamento foi feito manualmente entre uma área de alta verossimilhança. Os primers desenhados estão apresentados na Tabela 1.

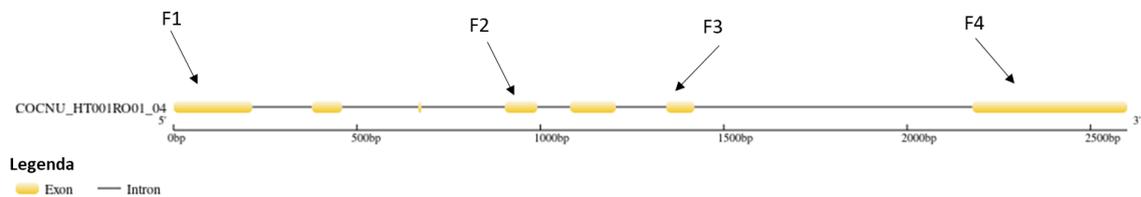


Figura 9: Esquema representativo do gene *WRINKLED 1*. Em amarelo as regiões codificantes. As setas indicam a posição dos primers forward desenhados, visando cobrir o máximo possível alguns éxons e íntrons.

Tabela 1: Primers desenhados a partir de sequências de *Cocos nucifera* para amplificação de segmentos de *WRINKLED 1* e *LEAFY COTYLEDON 1*.

Prime ID	Sequência 5'-3'
<i>WR11-1F</i>	TCCTCCATCTACTCCCCTCC
<i>WR11-1R</i>	TAAGGGCAGCCAAGTCATGA
<i>WR11-2F</i>	AGCCTTTAATGATGAGTTGGACG
<i>WR11-2R</i>	AGATGTACTTGCAGCCAAAGTC
<i>WR11-3F</i>	GAGGCCAGGCTTGGCAA
<i>WR11-3R</i>	CCCTTTATATTCTAAAGCAGCTAAATC
<i>WR11-4F</i>	CAACTCAAGAGGAGGCTGC
<i>WR11-4R</i>	TGCCAGCATACCCATTACA
<i>LEC1-1F</i>	CACGAAACTATGGTGGCTC
<i>LEC1-1R</i>	TTACTGCTTGTAGGGAGCATAGG

5.5 Marcadores para genes

Na análise de gradiente dos primers desenhados foi possível estabelecer uma única temperatura de 59°C como adequada para o pareamento de todos os pares de primers desenhados durante as PCRs, à exceção do conjunto de primers para o primeiro fragmento de 1000 pb, cuja amplificação não foi possível (Figura 10). Em alguns butiazais houve menor sucesso na amplificação dos fragmentos, por exemplo, quando utilizados os primers de *WR11-3*, seis dos dez indivíduos de Laguna não amplificaram, enquanto em Arambaré um de seis não amplificou, dois de dez de Palmares do Sul não amplificaram e todos de Osório amplificaram (Figura 11). Utilizando os primers de *LEC1*, apenas dois de dez indivíduos de Laguna amplificaram, dois de dez indivíduos de Palmares do Sul não amplificaram, apenas um de dez de Osório não amplificou e dois de sete de Arambaré não amplificaram. A falta de amplificação em alguns indivíduos pode dever-se à existência de mutações na região de pareamento dos primers, que precisa ainda ser confirmada, ou simplesmente devido a irregularidades na concentração de DNA utilizado como amostra (Figura 11). Nesse caso, esses primers podem ser usados como marcadores genéticos. Os fragmentos amplificados foram encaminhados para sequenciamento. O sequenciamento permitirá confirmar a identidade da sequência amplificada e comparar as sequências dos diferentes butiazeiros identificando se há existência de diferenças nucleotídicas.

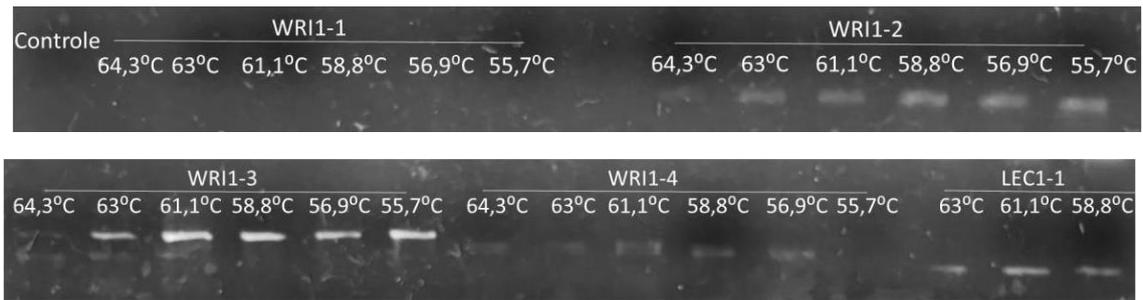
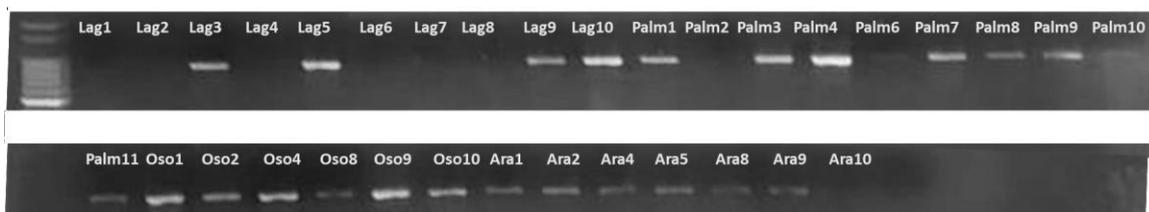


Figura 10: Amplificação de fragmentos de sequências putativas dos genes *WRK1* e *LEC1* de *Butia catarinensis* em gradiente de temperatura, a partir de primers desenhados usando sequências de *Cocos nucifera*.

A *WRK1*



B *LEC1*

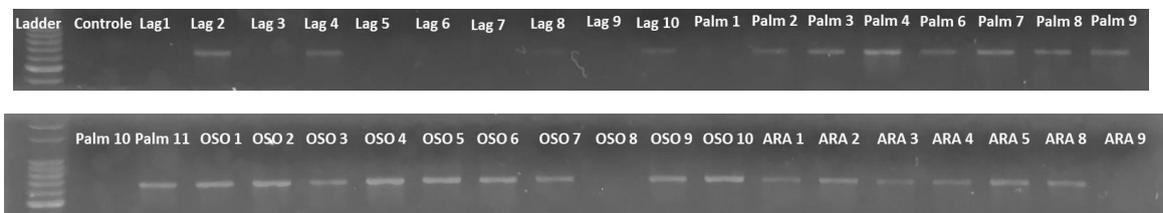


Figura 11: Amplificação de fragmentos de sequências putativas dos genes *WRK1* e *LEC1* em genótipos de *Butia catarinensis* e *B. odorata*, a partir de primers desenhados usando sequências de *Cocos nucifera*.

6. Discussão

A ampliação do conhecimento básico sobre espécies Cinderellas, como o *Butia odorata* e o *Butia catarinensis*, gera a perspectiva de incremento de uso com aumento de renda e consequentemente maior preservação destas. O óleo produzido por pirênios de butiás pode ser uma alternativa como fonte de energia verde (Vieira et al. 2016), auxiliando a reduzir o custo da matéria-prima para produção de biodiesel. Os trabalhos de quantificação de óleo de sementes de butiá presentes na literatura, até o momento, não trazem informação sobre a variabilidade desta característica entre butiazais (Faria et al. 2008; Vieira et al. 2016; Gallon et al. 2023), informação essencial para permitir futura seleção de genótipos.

A composição de sementes depende de fatores ambientais e genéticos e da interação destes (Čeh et al. 2020). Diferentes genótipos comumente produzem diferente conteúdo de óleo e perfil de ácidos graxos, como observado em *Cocos nucifera* (Laureles et al. 2002). Da mesma forma, o ambiente pode causar variações grandes na composição de óleo de sementes (Bellaloui et al. 2013; Liu et al. 2022), por exemplo, Rotundo e Westgate (2009) relataram diferença de 23% entre valores máximos e mínimos de óleo em soja em meta análise. No presente trabalho foram avaliados butiazeiros de quatro butiazais, dois da espécie *Butia odorata* (Palmares do Sul e Arambaré) e dois da espécie *Butia catarinensis* (Laguna e Osório). Devido ao longo período necessário para crescimento e início da fase reprodutiva da espécie, a análise das espécies em um mesmo ambiente não foi factível ao corrente trabalho. Assim, não foi possível avaliar adequadamente os efeitos da interação espécie - ambiente sobre a produção de óleo no presente estudo.

O conteúdo de óleo nos pirênios na média geral dos locais de coleta foi de 23%. Em outros trabalhos, considerando apenas as sementes sem os endocarpos, de *B. capitata* obtidas em Pelotas (RS), houve um rendimento de 52% de óleo (Vieira et al. 2016), e de 57,8% em sementes obtidas em Minas Gerais (Faria et al. 2008), enquanto em sementes de *B. odorata*, obtidas de empresa em Santa Maria (RS) que utiliza o mesocarpo, o rendimento foi de 40% (Gallon et al. 2023), ambos usando o método de Soxhlet para extração. No presente estudo optou-se pelo uso do pirênio, buscando a redução do número de etapas de processamento em caso de futuro uso industrial, pois a separação do endocarpo das amêndoas (sementes) é complexa para grandes volumes. Era esperado, portanto, que os valores percentuais de conteúdo de óleo obtidos desta forma fossem menores do que aqueles obtidos da extração direta da semente, uma vez que o endocarpo de frutos costuma ter teores menores de óleo que as sementes, sendo constituído principalmente de holocelulose (Melo 2015).

Em Laguna, um butiazeiro alcançou conteúdo de 40% de óleo nos pirênios, mas houve grande variação deste parâmetro entre butiazeiros deste local (Figura 3). De modo geral, observou-se uma leve tendência de maior conteúdo de óleo na espécie *Butia catarinensis*, principalmente devido a baixos teores em butiazeiros de Palmares do Sul (*Butia odorata*), onde ocorreu a maior taxa de predação de pirênios. A variabilidade observada para os caracteres analisados entre locais de coleta (populações) não foi superior à variabilidade encontrada dentro dos butiazais. Esse comportamento, em termos de variação genética, já foi anteriormente observado no gênero *Butia* (Buttow et al. 2010).

Os baixos teores de óleo e elevado percentual de predação encontrados em butiazeiros em Palmares do Sul sugerem que o consumo da semente pela larva de besouro causa uma perda na biomassa da semente e assim diminui o teor de óleo do pirênio. Avaliação de predação em pirênios de *B. odorata* identificou que insetos (*Revena plaumanni*, *Pachymerus bredwelli*) podiam ocupar, eventualmente, todo espaço da semente (Tonietto and Schlindwein 2016; Tonietto et al. 2021). Encontrou-se uma correlação negativa de 42% entre esses fatores (Figura 20). Interessantemente, parece haver uma relação de tamanho de pirênio com a porcentagem de predação, tendo sido encontrada correlação positiva de 43%. Butiazeiros de Palmares do Sul apresentaram as maiores áreas de pirênios, o indivíduo com menor tamanho médio de área em Palmares do Sul é maior entre os menores de todos os locais de coleta. Investigar o fator de atratividade pode ser importante para entender a sua significância ecológica.

Os pirênios de butiazeiros da espécie *B. catarinensis* tendem a apresentar uma razão comprimento/largura maior que os da espécie *B. odorata*, o que lhes confere um formato mais alongado em vez de arredondado, o que nem sempre ocorre, no entanto, conforme (Matos 2022). Variações nas dimensões comprimento e largura, bem como na distância do centro ao ápice do pirênio dentro da mesma planta foram observadas. Essas diferenças dentro da planta podem dever-se a variações do ambiente durante o desenvolvimento dos frutos ou mesmo a posição destes. A maturação dos frutos de *B. odorata* segue uma ordem, iniciando primeiro a maturação dos frutos em posições mais distais das ráquias e ráquis (Rosa et al. 1998). Em diversas espécies os frutos maiores são aqueles que iniciam e finalizam primeiro o seu desenvolvimento (Haverroth et al. 2021). Não se encontrou referência na literatura da correlação entre tamanho do fruto como um todo e do pirênio.

Considerando o uso industrial dos pirênios, a facilidade de moagem dos mesmos é um fator importante, pois representa gasto energético e duração do procedimento. O número de passagens pelo moedor para total moagem apresentou grande amplitude, mas novamente os pirênios dos butiazeiros de Laguna apresentaram maior adequação. É possível que pirênios mais resistentes possuam diferenças químicas (deposições de lignina, holocelulose) ou físicas (espessura) diversas dos demais. A dureza do endocarpo das frutas é controlada geneticamente, e genes envolvidos têm sido identificados em pêssego (Qui et al. 2022). O número de passagens apresentou correlação negativa de 34% com o teor de óleo.

A variação na amplificação de fragmentos dos genes *WR11* e *LEC1* pode dever-se a um possível polimorfismo nos genes no local de pareamento dos primers em indivíduos do mesmo local de coleta, ou também pode ser devida à qualidade e quantidade do DNA de algumas amostras. Isso ainda precisará ser otimizado. Tratando-se de genes envolvidos na regulação da síntese de lipídeos, esse polimorfismo pode estar relacionado com a variação no teor de óleo entre cada indivíduo da mesma população (local de coleta). Assim, esses primers poderiam ser utilizados como marcadores genéticos para seleção. Mesmo se monomórficos em gel, o sequenciamento poderá permitir a identificação de variações nucleotídicas e seu uso como marcadores (Nazareno and Reis 2011), bem como o desenvolvimento de marcadores SNP. Esses marcadores poderão ser utilizados para analisar a variabilidade de outras populações, e caso haja associação com o caráter, auxiliar na escolha de genótipos mais adequados para produção de óleo. Esse estudo, no entanto, está aquém do alcance possível ainda. Provavelmente, análises feitas por sequenciamento em larga escala de regiões genômicas próximas ou que englobem estes genes darão subsídios para mapeamento associativo em futuros estudos pretendidos pelo grupo de pesquisa em que este trabalho se insere.

A alta variabilidade em tamanho/peso e teor de óleo aponta para existência de variação genética para o caráter entre e dentro das populações, havendo a possibilidade de se encontrar genótipos com maior potencial para o uso na produção de óleo. A identificação e seleção destes genótipos pode ser usada para triagem da produção dos butiazeiros para melhor uso dos pirênios em butiazais consolidados. Pirênios oriundos de butiazeiros com baixo teor de óleo poderiam ser segregados para produção de biocombustíveis a partir de pirólise (Mumbach et al. 2022), tecnologia robusta que por processo de conversão térmica decompõe biomassa lignocelulósica em biocombustíveis de valor agregado. Marcadores genéticos também podem permitir a escolha de indivíduos como planta-matriz e a rápida avaliação da progênie para formação de futuros butiazais com maior potencial produtivo, aumentando o interesse pelo cultivo deste gênero. Mesmo se os polimorfismos não estiverem associados ao caráter produção de óleo, podem ser úteis em estudos genéticos e ecológicos. A disponibilidade de marcadores genéticos para o gênero *Butia* é insipiente (Buttow et al. 2010; Gaiero et al. 2011; Nazareno and Reis 2011), e considerando a contínua fragmentação das populações de *Butia*, é iminente a necessidade de métodos de caracterização genéticos mais robustos para conservação da diversidade (Cidón et al. 2023).

7. Considerações finais

O gênero *Butia* tem muito a oferecer tanto em relação ao ecossistema em que está inserido quanto economicamente. Este estudo demonstra que há variabilidade entre e dentro dos butiazais das espécies *Butia odorata* e *B. catarinensis* quanto à produção de óleo, à atração de predadores, à resistência do endocarpo e às características biométricas dos pirênios. Há, portanto, grande quantidade de diversidade genética a ser identificada e explorada em estudos sobre diversidade. Sendo possível selecionar indivíduos com aptidão à produção de óleo, além de outros possíveis usos para o subutilizado pirênio e para a planta como um todo.

A resistência do endocarpo gera aumento no número de passagens necessárias pelo moinho, que apresentou correlação negativa com o teor de óleo, indicando que maior dureza do endocarpo, além de prejudicar o processamento, também afetando o rendimento de óleo. O conteúdo de óleo apresentou correlação negativa com percentual de predação, o que sugere que a predação pode levar ao consumo da massa das amêndoas. Ainda, segundo a análise de correlação, pirênios menores rendem mais óleo.

É possível clonar genes e desenvolver marcadores genéticos para o gênero *Butia* a partir das sequências conhecidas de outras palmeiras, como *Cocos nucifera*. Este desenvolvimento de marcadores genéticos é essencial para o estabelecimento de estratégias para a manutenção da diversidade genética do gênero. Foi possível amplificar sequências homólogas aos genes *WRINKLED 1* e *LEAFY COTYLEDON 1*, reguladores da síntese de óleo em plantas, a partir das quais será possível desenvolver marcadores moleculares.

A importância da preservação da biodiversidade e dos ecossistemas/habitats em declínio é um tópico que tem crescido em importância com a maior ocorrência dos fenômenos climáticos extremos e aumento das flutuações gerais de temperatura. Este trabalho amplia as informações sobre variabilidade no gênero *Butia* e busca mobilizar em favor de novos usos dos produtos deste gênero, agregando valor econômico para proteção destas espécies nativas.

Referências Bibliográficas

- Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS (2009) MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* 37:W202–W208. doi: 10.1093/nar/gkp335
- Barbieri RL (ed) (2015) Vida no butiazal, 1a edição. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, DF
- Baud S, Lepiniec L (2010) Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Prog Lipid Res* 49:235–249. doi: 10.1016/j.plipres.2010.01.001
- Bellaloui N, Mengistu A, Kassem MA (2013) Effects of genetics and environment on fatty acid stability in soybean seed. *Food Nutr Sci* 04:165–175. doi: 10.4236/fns.2013.49A1024
- Buttow MV, Castro CM, Schwartz E, Tonietto A, Barbieri RL (2010) Caracterização molecular de populações de *Butia capitata* (Arecaceae) do Sul do Brasil através de marcadores AFLP. *Rev Bras Frutic* 32:230–239. doi: 10.1590/S0100-29452010005000001
- Čeh B, Štraus S, Hladnik A, Kušar A (2020) Impact of linseed variety, location and production year on seed yield, oil content and its composition. *Agronomy* 10:1770. doi: 10.3390/agronomy10111770
- Cernac A, Benning C (2004) *WRINKLED1* encodes an *AP2/EREB* domain protein involved in the control of storage compound biosynthesis in Arabidopsis: *WRI1* controls seed oil biosynthesis. *Plant J* 40:575–585. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02235.x
- Cidón CF, Turchetto-Zolet AC, Bajay MM, Zucchi MI, Konzen ER (2023) Phenotypic and molecular basis for genetic variation in jelly palms (*Butia* sp.): where are we now and where are we headed to? *Genet Mol Biol* 46:e20230145. doi: 10.1590/1678-4685-gmb-2023-0145
- Corrêa LB, Barbieri RL, Rossato M, Büttow MV, Heiden G (2009) Caracterização citológica de palmeiras do gênero *Butia* (Arecaceae). *Rev Bras Frutic* 31:1111–1116. doi: 10.1590/S0100-29452009000400026
- Dey S, Reang NM, Das PK, Deb M (2021) A comprehensive study on prospects of economy, environment, and efficiency of palm oil biodiesel as a renewable fuel. *J Clean Prod* 286:124981. doi: 10.1016/j.jclepro.2020.124981
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15.
- Faria JP, Arellano DB, Grimaldi R, Silva LCRD, Vieira RF, Silva DBD, Agostini-Costa TDS (2008) Caracterização química da amêndoa de coquinho-azedo (*Butia capitata* var *capitata*). *Rev Bras Frutic* 30:549–552. doi: 10.1590/S0100-29452008000200049
- Gaiero P, Mazzella C, Agostini G, Bertolazzi S, Rossato M (2011) Genetic diversity among endangered Uruguayan populations of *Butia* Becc. species based on ISSR. *Plant Syst Evol* 292:105–116. doi: 10.1007/s00606-010-0412-0
- Gepts P (2023) Biocultural diversity and crop improvement. *Emerg Top Life Sci* 7:151–196. doi: 10.1042/ETLS20230067

Haverroth EJ, Musa FA, Coelho FK, Duarte VDF, Pereira MB, Pacheco MT, Federizzi LC, Delatorre CA (2021) Dissection of grain weight across the oat panicle. *Agronomy Journal* 113:1492–1502. doi: 10.1002/agj2.20550

Hoffmann JF, Barbieri RL, Rombaldi CV, Chaves FC (2014) *Butia* spp. (*Arecaceae*): An overview. *Sci Hortic* 179:122–131. doi: 10.1016/j.scienta.2014.08.011

Hu B, Jin J, Guo A-Y, Zhang H, Luo J, Gao G (2015) GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics* 31:1296–1297. doi: 10.1093/bioinformatics/btu817

Kaushik N, Kumar K, Kumar S, Kaushik N, Roy S (2007) Genetic variability and divergence studies in seed traits and oil content of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) accessions. *Biomass Bioenergy* 31:497–502. doi: 10.1016/j.biombioe.2007.01.021

Kobelnik M, Fontanari GG, Marques MR, Ribeiro CA, Crespi MS (2016) Thermal behavior and chromatographic characterization of oil extracted from the nut of the *Butia* (*Butia capitata*). *J Therm Anal Calorim* 123:2517–2522. doi: 10.1007/s10973-016-5239-7

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096

Laureles LR, Rodriguez FM, Reaño CE, Santos GA, Laurena AC, Mendoza EMT (2002) Variability in fatty acid and triacylglycerol composition of the oil of coconut (*Cocos nucifera* L.) hybrids and their parentals. *J Agric Food Chem* 50:1581–1586. doi: 10.1021/jf010832w

Leakey RRB (2012) Participatory Domestication of indigenous fruit and nut trees: new crops for sustainable agriculture in developing countries. In: Gepts P, Famula TR, Bettinger RL, Brush SB, Damania AB, McGuire PE, Qualset CO (eds) *Biodiversity in Agriculture*, 1st edn. Cambridge University Press, pp 479–501

Liu J, Chen M, Zhang Y, Zheng B (2022) Analyses of the oil content, fatty acid composition, and antioxidant activity in seeds of *Thlaspi arvense* L. from different provenances and correlations with environmental factors. *Chem Biol Technol Agric* 9:11. doi: 10.1186/s40538-021-00276-x

Manir M (2023) Por que a brasileira macaúba é a planta da vez na produção de biocombustíveis. O Estado de S.Paulo <https://www.biodieselbr.com/noticias/materia-prima/macauaba/por-que-a-brasileira-macauba-e-a-planta-da-vez-na-producao-de-biocombustiveis-261023>

Marega Filho M, Destro D, Miranda LA, Spinosa WA, Carrão-Panizzi MC, Montalván R (2001) Relationships among oil content, protein content and seed size in soybeans. *Braz Arch Biol Technol* 44:23–32. doi: 10.1590/S1516-89132001000100004

Matos E T de (2022) Variação fenotípica e genética para variáveis biométricas e produtividade de frutos em acessos de *Butia odorata* e *Butia catarinensis*. 44 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Ênfase em Gestão Ambiental Marinha e Costeira, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Osório, 2022. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/239280>.

Melo P (2015) Estudo das propriedades físico-químicas de membranas de acetato de celulose/glicerol incorporadas com aditivos de lignina extraída do endocarpo da Macaúba (*Acrocomia aculeata*) e seus derivados modificados quimicamente. Universidade Federal de Uberlândia

Mistura CC, Barbieri RL, Castro CM, Padulosi S, Alercia A (2016) Descriptors for on-farm conservation and use of *Butia odorata* natural populations. *Plant Genet Resour* 14:35–40. doi: 10.1017/S1479262115000040

- Mizik T, Gyarmati G (2021) Economic and Sustainability of biodiesel production—A Systematic Literature Review. *Clean Technol* 3:19–36. doi: 10.3390/cleantechnol3010002
- Moura RCD, Lopes PSN, Brandão Junior DDS, Gomes JG, Pereira MB (2010) Biometria de frutos e sementes de *Butia capitata* (Mart.) Beccari (*Arecaceae*), em vegetação natural no Norte de Minas Gerais, Brasil. *Biota Neotropica* 10:415–419. doi: 10.1590/S1676-06032010000200040
- Mumbach GD, Alves JLF, Da Silva JCG, Domenico MD, Marangoni C, Machado RAF, Bolzan A (2022) Investigation on prospective bioenergy from pyrolysis of butia seed waste using TGA-FTIR: Assessment of kinetic triplet, thermodynamic parameters and evolved volatiles. *Renewable Energy* 191:238–250. doi: 10.1016/j.renene.2022.03.159
- Nazareno AG, Reis MSD (2011) The same but different: Monomorphic microsatellite markers as a new tool for genetic analysis. *American J of Botany*. doi: 10.3732/ajb.1100163
- Nazareno AG, Dos Reis MS (2013) Data from: At risk of population decline? An ecological and genetic approach to the threatened palm species *Butia eriospatha* (*Arecaceae*) of southern Brazil. 131521 bytes.
- Noblick L (2014) *Butia*: What we think we know about the genus. *Palm J* 5–23.
- Paradis E, Claude J, Strimmer K (2004) APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* 20:289–290. doi: 10.1093/bioinformatics/btg412
- Paradis E (2010) Pegas: an R package for population genetics with an integrated–modular approach. *Bioinformatics* 26:419–420. doi: 10.1093/bioinformatics/btp696
- Pfaffl MW (2002) Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30:36e–336. doi: 10.1093/nar/30.9.e36
- Prabhu C, Navaneetha Krishnan B, Prakash T, Rajasekar V, Balasubramanian D, Le VV, Linh Le NV, Phong Nguyen PQ, Nguyen VN (2023) Biodiesel unsaturation and the synergic effects of hydrogen sharing rate on the characteristics of a compression ignition engine in dual-fuel mode. *Fuel* 334:126699. doi: 10.1016/j.fuel.2022.126699
- Qui K, Zhou H, Pan H, Sheng Y, Yu H, Xie Q, Chen H, Cai Y, Zhang J, He J (2022) Genome-wide identification and functional analysis of the peach (*P. persica*) laccase gene family reveal members potentially involved in endocarp lignification. *Trees* 36:1477–1496. doi: 10.1007/s00468-022-02296-y
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AFM (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 339:62–66. doi: 10.1016/S0304-3940(02)01423-4
- Ramos M, Dias APS, Puna JF, Gomes J, Bordado JC (2019) Biodiesel Production Processes and Sustainable Raw Materials. *Energies* 12:4408. doi: 10.3390/en12234408
- Revell LJ (2011) Phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution*. doi: <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00169.x>

- Rosa L, Castellani TT, Reis A (1998) Biologia reprodutiva de *Butia capitata* (Martius) Beccari var. *odorata* (Palmae) na restinga do município de Laguna, SC. *Revta brasil Bot.* doi: 10.1590/S0100-84041998000300007
- Rotundo JL, Westgate ME (2009) Meta-analysis of environmental effects on soybean seed composition. *Field Crops Res* 110:147–156. doi: 10.1016/j.fcr.2008.07.012
- Sagun JV, Yadav UP, Alonso AP (2023) Progress in understanding and improving oil content and quality in seeds. *Front Plant Sci* 14:1116894. doi: 10.3389/fpls.2023.1116894
- Schliep, K. P. phangorn: Phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*, v. 27, n. 4, p. 592–593, fev. 2011. doi: 10.1093/bioinformatics/btq706.
- Singh R, Ong-Abdullah M, Low E-TL, Manaf MAA, Rosli R, Nookiah R, Ooi LC-L, Ooi S, Chan K-L, Halim MA, Azizi N, Nagappan J, Bacher B, Lakey N, Smith SW, He D, Hogan M, Budiman MA, Lee EK, DeSalle R, Kudrna D, Goicoechea JL, Wing RA, Wilson RK, Fulton RS, Ordway JM, Martienssen RA, Sambanthamurthi R (2013) Oil palm genome sequence reveals divergence of interfertile species in Old and New worlds. *Nature* 500:335–339. doi: 10.1038/nature12309
- Soares KP, Longhi SJ, Witeck Neto L, Assis LC de (2014) Palmeiras (Arecaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Rodriguésia* 65:113–139. doi: 10.1590/S2175-78602014000100009
- Sosinski ÊE, Urruth LM, Barbieri RL, Marchi MM, Martens SG (2019) On the ecological recognition of *Butia* palm groves as integral ecosystems: Why do we need to widen the legal protection and the in situ/on-farm conservation approaches? *Land Use Policy* 81:124–130. doi: 10.1016/j.landusepol.2018.10.041
- Sun R, Ye R, Gao L, Zhang L, Wang R, Mao T, Zheng Y, Li D, Lin Y (2017) Characterization and Ectopic Expression of *CoWR11*, an AP2/EREBP Domain-Containing Transcription Factor from Coconut (*Cocos nucifera* L.) endosperm, changes the seeds oil content in transgenic *Arabidopsis thaliana* and rice (*Oryza sativa* L.). *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2017.00063
- Tanabata T, Shibaya T, Hori K, Ebana K, Yano M (2012) *SmartGrain* : High-Throughput phenotyping software for measuring seed shape through image analysis. *Plant Physiol* 160:1871–1880. doi: 10.1104/pp.112.205120
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- TEAM, R Core. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Publicado em 2024, Viena - Áustria. Disponível em: <https://www.r-project.org/>
- Tinius CN, Burton JW, Carter TE (1993) Recurrent selection for seed size in soybean: III. Indirect effects on seed composition. *Crop Sci* 33:959–962. doi: 10.2135/cropsci1993.0011183X003300050017x
- To A, Joubès J, Barthole G, Lécureuil A, Scagnelli A, Jasinski S, Lepiniec L, Baud S (2013) WRINKLED Transcription Factors Orchestrate Tissue-Specific Regulation of Fatty Acid Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24:5007–5023. doi: 10.1105/tpc.112.106120

Tonietto A, Schlindwein G (2016) Occurrence of *Revena plaumanni* Bondar, 1943 (Coleoptera: Curculionidae) in Pindo palm fruit. Rev Bras Frutic. doi: 10.1590/0100-29452016012

Tonietto A, Schlindwein G, Efrom CFS (2021) Contribution about the occurrence of *Pachymerus bridwelli* (Prevet) (Coleoptera: Chrysomelidae) in diaspores of pindo palm (*Butia odorata*) (Barb.Rodr.) Noblick & Lorenzi. Rev Ceres 68:149–154. doi: 10.1590/0034-737x202168020009

Tonkin-Hill, G. et al. RhierBAPS: An R implementation of the population clustering algorithm hierBAPS. Wellcome open research, vol. 3, Jul. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6178908>

Tozetti AM, Farina RK, Raguse-Quadros M (eds) (2022) Patrimônio natural dos Butiazais da Fazenda São Miguel. Editora Fi

Vieira BM, Elicker C, Nunes CFP, Bairros AV, Becker EM, De Oliveira DM, Piva E, Fontoura LAM, Pereira CMP (2016) The synthesis and characterization of *Butia capitata* seed oil as a FAME feedstock. Fuel 184:533–535. doi: 10.1016/j.fuel.2016.07.052

Wei T, Simko V (2024). R package 'corrplot': Visualization of a Correlation Matrix. (Version 0.95), <https://github.com/taiyun/corrplot>.

Wickham H (2011) ggplot2. WIREs Computational Stats 3:180–185. doi: 10.1002/wics.147

Xu C, Wu T, Yuan S, Sun S, Han T, Song W, Wu C (2022) Can soybean cultivars with larger seed size produce more protein, lipids, and seed yield? a meta-analysis. Foods 11:4059. doi: 10.3390/foods11244059

Yang Y, Bocs S, Fan H, Armero A, Baudouin L, Xu P, Xu J, This D, Hamelin C, Iqbal A, Qadri R, Zhou L, Li J, Wu Y, Ma Z, Issali AE, Rivallan R, Liu N, Xia W, Peng M, Xiao Y (2021) Coconut genome assembly enables evolutionary analysis of palms and highlights signaling pathways involved in salt tolerance. Commun Biol 4:105. doi: 10.1038/s42003-020-01593-x

Yu, G. Ggtree: a serialized data object for visualization of phylogenetic tree and annotation data. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.21.348169>

Zuleta EC, Baena L, Rios LA, Calderón JA (2012) The oxidative stability of biodiesel and its impact on the deterioration of metallic and polymeric materials: a review. J Braz Chem Soc 23:2159–2175. doi: 10.1590/S0103-50532012001200004

Apêndice

1. Coordenadas geográficas dos indivíduos de *Butia* sp amostrados no estudo.

Indivíduo	Coordenadas
Laguna 01	-28.50489, -48.75847
Laguna 05	-28.50559, -48.75873
Laguna 06	-28.50593, -48.75891
Laguna 09	-28.50594, -48.75811
Laguna 12	-28.50604, -48.75709
Laguna 13	-28.50665, -48.75623
Arambaré SN	-30.88091, -51.4865
Arambaré 02	-30.88802, -51.48752
Arambaré 08	-30.89903, -51.48706
Arambaré 09	-30.89858, -51.48663
Arambaré 14	-30.89751, -51.48568
Arambaré 19	-30.90318, -51.49045
Osório 02	-29.90553, -50.24755
Osório 14	-29.90381, -50.24626
Osório 15	-29.9037, -50.24658
Osório 17	-29.77633, -50.1607
Palmares SN	-30.28314167, -50.48172333
Palmares 06	-30.28528167, -50.47844333
Palmares N06	-30.28412167, -50.48149000

2. Código de R utilizado para produção de imagens

```
#ANÁLISE DA BIOMETRIA DE FRUTOS
```

```
dados
```

```
attach(dados)
```

```
names(dados)
```

```

boxplot(Area ~ Progenie)

hist(Area)

require(ggplot2)

require(dplyr)

require(tidyverse)

?fct_inorder

(grafico = ggplot(data = dados, aes(y= , x= fct_inorder(Progenie))) +

  geom_violin(linewidth = 0.5) +

  geom_boxplot(aes(color = Populacao), width=0.2, outlier.size = 0.8, outlier.alpha = 0.6, show.legend = FALSE) +

  scale_x_discrete(labels=c("Arambare14" = "ARA14", "Arambare15" = "ARA15", "Arambare19" =
"ARA19", "Arambare2" = "ARA02", "Arambare6" = "ARA06", "Arambare8" = "ARA08", "Arambare9" = "ARA09",
"SN" = "ARASN", "Laguna1" = "LAG1", "Osorio14" = "OSO14", "Osorio15" = "OSO15", "Osorio17" = "OSO17",
"Osorio2" = "OSO02", "Osorio6" = "OSO06", "Palmares6" = "PAL06", "PalmaresNovo" = "PALNO"))+

  theme(axis.text.x = element_text(angle = 45, size = 6, hjust = 1))+ stat_summary(fun = mean, geom = "point", shape
= 8, size = 0.5, color = "gray60") + labs(y=bquote("Perimetro coquinho" (mm^2)), x="Progênie") +
  geom_hline(aes(yintercept = mean(Perimetro)), linetype = "dashed", color = "gray60", linewidth =
0.4)+scale_y_continuous(limits = c(0,100), breaks = seq(0,100,10))+ theme_light() )+ annotate("text", x=1, y=155,
label = "ghi")

grafico

#EXPORTAR O GRÁFICO EM ALTA RESOLUÇÃO

jpeg('C:/temp/Documents/Universidade/R/figs/Distância.jpeg', units="in", width=10, height=6, res=600)

grafico

dev.off()

#MEDIAS POR PROGENIE

dados

media = tapply(dados$Area, dados$Progenie, mean)

media

#CORRELOGRAMA

attach(correlacao_)

M = cor(correlacao_)

library(corrplot)

dev.new()

(corrplot(M, method = 'circle'))

(corrplot(M, method = 'number'))

testRes = cor.mtest(M, conf.level = 0.95)

corrplot(M, method = 'circle', type = 'lower', insig='blank',

  addCoef.col = 'black', number.cex = 0.8, order = 'AOE', diag=FALSE)

```