

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

PATRÍCIA DE OLIVEIRA NEVES

×*Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster (ARECACEAE): evidências da origem híbrida por meio de análises anatômicas e moleculares

**São Gabriel
2023**

PATRÍCIA DE OLIVEIRA NEVES

×*Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster (ARECACEAE): evidências da origem híbrida por meio de análises anatômicas e moleculares

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Ciências Biológicas - PPGCB, da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Batista Pereira
Coorientador: Prof. Dr. Bruno Francisco Sant'Anna dos Santos

**São Gabriel
2023**

PATRÍCIA DE OLIVEIRA NEVES

×*Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster (ARECACEAE): evidências da origem híbrida por meio de análises anatômicas e moleculares

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas..

Dissertação defendida e aprovada em: 15, agosto de 2023.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Antônio Batista Pereira
Orientador
UNIPAMPA

Prof. Dra. Sofia Aumond Kuhn
UFRGS

Prof. Dra. Bruna Lúcia Laindorf
SESI

Prof. Dr. Jair Putzke

UNIPAMPA



Assinado eletronicamente por **ANTONIO BATISTA PEREIRA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 23/08/2023, às 10:16, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Sofia Aumond Kuhn, Usuário Externo**, em 23/08/2023, às 13:42, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Bruna Lucia Laindorf, Usuário Externo**, em 23/08/2023, às 21:27, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **JAIR PUTZKE, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 24/08/2023, às 11:03, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1213086** e o código CRC **C0C8A930**.

RESUMO

×*Butyagrus nabonnandii* é uma palmeira híbrida, fruto do cruzamento entre *Butia odorata* e *Syagrus romanzoffiana*, de distribuição restrita ao Brasil e Uruguai. Assim como os parentais, pertence à subfamília Arecoideae, tribo Cocoseae e subtribo Attaleinae. Cada vez mais, estudos demonstram a relevância da anatomia foliar como importante ferramenta taxonômica em Arecaceae. Outras ferramentas, entretanto, são citadas de interesse para a taxonomia, como exemplo, a biologia molecular. Até o momento, a identificação desse híbrido se deu apenas por meio da morfologia vegetal, revelando que apresenta caracteres intermediários de ambos os parentais. Este estudo avalia a origem híbrida de ×*Butyagrus nabonnandii* por meio de ferramentas anatômicas e moleculares, inferindo se a anatomia vegetal e a biologia molecular correspondem a ferramentas taxonomicamente úteis. Foram coletadas folhas dos três táxons, em cinco municípios do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, durante 2021 e 2022. Para a abordagem anatômica, foram realizados cortes da porção central da pina, considerando a margem, região intermediária e nervura mediana. Para a abordagem molecular, inicialmente foram testados diferentes métodos de preservação e maceração do DNA genômico de folhas e estipe de ×*B. nabonnandii*. Em seguida, avaliou-se as regiões sequenciadas da família gênica WRKY para determinar sua efetividade na identificação de híbridos entre *B. odorata* e *S. romanzoffiana*. A anatomia da pina provou ser útil na identificação do híbrido, diferenciando-o das espécies parentais. O DNA isolado de folhas e estipe de ×*B. nabonnandii*, independentemente do método utilizado, apresentou boa qualidade, uma vez que as regiões genômicas de interesse foram amplificadas. Além disso, foi possível inferir a hibridização entre *B. odorata* e *S. romanzoffiana*, e assim, identificar o híbrido fruto desse cruzamento. Esses resultados demonstraram que a anatomia vegetal e a biologia molecular são ferramentas tão valiosas quanto a morfologia vegetal para a identificação de ×*B. nabonnandii* e evidenciação da sua origem híbrida.

Palavras-chave: palmeira híbrida; taxonomia; anatomia foliar; DNA genômico; família gênica WRKY.

ABSTRACT

×Butyagrus nabonnandii is a hybrid palm from the cross *Butia odorata* and *Syagrus romanzoffiana*, restricted to Brazil and Uruguay. It belongs to the subfamily Arecoideae, tribe Cocoseae, and subtribe Attaleinae as its parental species. Increasingly, leaf anatomy has become a central taxonomic tool in Areaceae. However, other tools, such as molecular biology, are considered of interest for taxonomy. Thus far, the identification of this hybrid relied only on its morphology, which revealed intermediate characters of both parents. This study evaluates the hybrid origin of *×B. nabonnandii* using anatomical and molecular tools, inferring whether plant anatomy and molecular biology are taxonomically useful tools. Leaves of the three taxa were collected in five municipalities of Rio Grande do Sul State, Brazil, during 2021 and 2022. For the anatomical approach, the central portion of the pinna was sectioned, including the margin, intermediate region, and midrib. For the molecular approach, first, different methods of preservation and maceration of genomic DNA extracted from leaves and stipes of *×B. nabonnandii* were tested. Next, we evaluated the sequenced regions of the WRKY gene family to determine their effectiveness in identifying hybrids between *B. odorata* and *S. romanzoffiana*. Pinnae anatomy proved useful in identifying the hybrid and differentiating it from the parental species. The DNA isolated from leaves and stipes of *×B. nabonnandii*, regardless of the method, presented good quality as the genomic regions of interest were amplified. In addition, it was possible to infer the hybridization between *B. odorata* and *S. romanzoffiana* and, thus, identify the hybrid resulting from this cross. These results demonstrated that plant anatomy and molecular biology are tools as valuable as plant morphology for identifying *×B. nabonnandii* and proving its hybrid origin.

Keywords: genomic DNA; hybrid palm; leaf anatomy; taxonomy; WRKY gene family.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Antônio Batista Pereira por ter me aceito como aluna e me dado toda a liberdade de ação, sempre disponível quando solicitado;

Ao Prof. Dr. Bruno Sant'Anna dos Santos, que aceitou o desafio de me coorientar e colaborar com seu expressivo conhecimento na área da anatomia vegetal;

Ao Prof. Dr. Andrés Cañedo, cuja colaboração foi imprescindível para a obtenção dos dados moleculares. Pessoa iluminada. Gratidão eterna!

Ao Prof. Dr. Velci Queiroz de Souza, cuja colaboração foi essencial na geração de dados e análises estatísticas;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), por financiar parcialmente este estudo;

Ao Laboratório de Diversidade Genética Animal (DGA-UNIPAMPA), ao Laboratório de Anatomia e Biomecânica Vegetal da Universidade Federal do Paraná (LABV-UFPR) e ao Núcleo de Estudos da Vegetação Antártica (NEVA-UNIPAMPA) pelo empréstimo de equipamentos para as análises moleculares e anatômicas;

À minha família que sempre me apoia e torce por mim, em especial à minha mãe, que desde o meu ingresso no serviço público me incentivou a fazer este doutorado, preocupada com minha aposentadoria (risos);

Às colegas Dra. Lurdes Zanchetta da Rosa e Dra. Bruna Laindorf, pela parceria nas coletas de campo e pelas incontáveis trocas de experiências. À Bruna também pelas hospedagens em sua residência nas coletas de campo em Venâncio Aires;

Ao meu colega Maike Brum Azambuja, parceiro de bancada, de sala, de trocas de ideias, que juntos desbravamos os mistérios da molecular e compartilhamos os medos, as decepções, os desafios, as alegrias e os demais sentimentos que todo pós-graduando enfrenta durante a jornada;

À amiga e colega Profa. Dra. Lúcia Helena do Canto Vinadé, que muito me incentivou a realizar esse doutorado;

Aos colegas do setor de laboratórios da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)/campus São Gabriel, pela disponibilidade em ajudar sempre que solicitados;

Às demais pessoas que contribuíram com a conclusão deste trabalho;

À mim!

Minha gratidão!

“São os caminhos difíceis que nos levam aos finais felizes”

(autor desconhecido)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	9
1.1	Hibridização natural em Arecaceae.....	9
1.2	<i>Butia odorata</i> (Barb. Rodr.) Noblick.....	9
1.3	<i>Syagrus romanzoffiana</i> (Cham.) Glassman.....	10
1.4	× <i>Butyagrus nabonnandii</i> (Prosch.) Vorster.....	11
1.4.1	Relatos de ocorrência e registro de × <i>B. nabonnandii</i> no Rio Grande do Sul (RS).....	12
1.5	Implicações da anatomia foliar em Arecaceae.....	13
1.6	Implicações da biologia molecular na taxonomia.....	14
1.6.1	Família gênica WRKY.....	15
1.6.2	Marcadores SNP (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)	16
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	Geral.....	17
2.2	Específicos.....	17
3	MANUSCRITO 1.....	18
	Leaf anatomy of × <i>Butyagrus nabonnandii</i> (Prosch.) Vorster as a tool for its identification	
4	MANUSCRITO 2.....	34
	Análise quali-quantitativa do DNA genômico extraído de folha e estipe de × <i>Butyagrus nabonnandii</i> (Prosch.) Vorster	
5	MANUSCRITO 3.....	44
	Evidência molecular da hibridização entre <i>Butia odorata</i> (Barb. Rodr.) Noblick e <i>Syagrus romanzoffiana</i> (Cham.) Glassman por meio de análises de regiões WRKY	
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
	ANEXO I.....	57
	ANEXO II.....	60

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Hibridização natural em Arecaceae

Dentro das fanerógamas, Arecaceae Schultz Sch. corresponde a uma das maiores e mais importantes famílias nas regiões tropicais, tanto em número quanto em abundância (Lima & Almeida Jr., 2020), compreendendo cinco subfamílias, 181 gêneros e aproximadamente 2600 espécies, com predomínio de concentração nas regiões tropicais e subtropicais (Asmussen *et al.*, 2006; Baker & Dransfield, 2016). No Brasil, são notificados 87 gêneros e 388 espécies (Soares *et al.*, 2023), sendo que para o estado do Rio Grande do Sul (RS), são reconhecidos cinco gêneros, 15 espécies e dois híbridos naturais (Soares *et al.*, 2014a).

Os híbridos podem ocorrer onde as populações de espécies de ocorrência natural e estreitamente relacionadas se sobrepõem, onde as espécies em questão têm sincronia no período fenológico, sucesso na transferência de pólen, ausência de barreira química e compatibilidade genética (Vallejo-Marín & Hiscock, 2016; Noblick, 2017a).

Em Arecaceae, é comum a ocorrência de híbridos naturais de origem interespecífica, com registro na literatura envolvendo os gêneros *Phoenix* L. (Pintaud *et al.*, 2010; Gros-Balthazard, 2013; Flowers *et al.*, 2019), *Attalea* Kunth (Lorenzi, 2010) e *Syagrus* Mart. (Glassman, 1970; Noblick, 2012; Soares *et al.*, 2014b; Soares & Assis, 2015; Noblick, 2017a). Segundo Noblick (2017a), híbridos naturais ocorrem com maior frequência em *Syagrus* em comparação com outros gêneros de palmeiras, razão ainda pouco especulada.

A formação de híbridos naturais a partir de cruzamentos intergenéricos, entretanto, já são mais raros no Brasil e envolvem o cruzamento entre *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman. com espécies do gênero *Butia* (Becc.) Becc., formando o notogênero \times *Butyagrus* Vorster (Noblick, 2010a; Soares *et al.*, 2014a; Engels *et al.*, 2021). Até o momento foram descritos três híbridos de *Butyagrus*, sendo eles: \times *B. nabonnandii* (Prosch.) Vorster; \times *B. alegretensis* K. Soares; e, \times *B. paranaensis* Engels, T.A.Meyer & K.Soares. Os dois primeiros ocorrem no estado do Rio Grande do Sul, envolvendo *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick e *Butia lallemantii* Deble & Marchiori, respectivamente; e o terceiro, no estado do Paraná, envolvendo *Butia eriospatha* (Mart. ex Drude) Becc.

1.2 *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick

Butia (Becc.) Becc. é um gênero monofilético, pertencente à subfamília Arecoideae, tribo Cocoseae e subtribo Attaleinae (Morrow *et al.*, 2009, 2015; Baker & Dransfield, 2016), reunindo,

atualmente, 22 espécies com posição taxonômica clara e aceita (Azambuja & Pereira, 2022).

No Brasil, *Butia odorata* apresenta uma distribuição geográfica natural restrita ao estado do Rio Grande do Sul (Noblick, 2010), estendendo-se até o sudeste do Uruguai (Rivas *et al.*, 2017). No âmbito nacional, o Rio Grande do Sul corresponde ao segundo principal centro de diversidade e endemismo do gênero (Eslabão *et al.*, 2016), onde *B. odorata* corresponde à principal espécie formadora do ecossistema butiazal, que é cada vez mais raro na paisagem em razão da expansão das áreas agrícolas e urbanas (Portelina *et al.*, 2020). Áreas contínuas dessa fitofisionomia podem ser ainda observadas nos municípios gaúchos de Tapes e Barra do Ribeiro (Marchi *et al.*, 2018).

No bioma Pampa, *Butia odorata* corresponde à espécie do gênero com mais ampla distribuição, com ocorrência concentrada na Encosta e Serra do Sudeste e na Planície Costeira na região sul do estado, desde Viamão ao norte até Santa Vitória do Palmar no sul (Eslabão *et al.*, 2015). Frequente é também a sua presença ao longo das estradas, disseminadas, não intencionalmente, pelo homem e pela fauna (Soares *et al.*, 2014a).

Apesar de estar amplamente distribuída pelo território onde ocorre naturalmente, *Butia odorata* atualmente consta na lista de espécies da flora ameaçada da IUCN (2012), na categoria vulnerável (VU) e também na lista de espécies ameaçadas de extinção da flora do Rio Grande do Sul (FZB/RS, 2014), na categoria em perigo de extinção (EN).

1.3 *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman

Assim como *Butia*, *Syagrus* corresponde a um gênero monofilético, pertencente à subfamília Arecoideae, tribo Cocoseae e subtribo Attaleinae (Merrow *et al.* 2009, 2015; Baker & Dransfield, 2016; Noblick, 2017a), compreendendo, atualmente, 69 espécies e duas subespécies (Noblick 2017a, 2018; Soares & Guimarães 2019; Sant'Anna-Santos *et al.* 2023a, 2023b).

Syagrus romanzoffiana corresponde dentro do gênero, à palmeira com mais ampla distribuição natural e a mais cultivada no paisagismo urbano e rural (Soares, 2020). Apresenta uma ampla distribuição geográfica pela América do sul, estando representada no Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina (Noblick, 2010b; Noblick, 2017a). No Brasil, pode ser encontrada em uma variedade de habitats, especialmente florestais, abrangendo os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás (Noblick, 2017b).

1.4 ×*Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster

No início do século XX, Barbosa Rodrigues (1903) foi quem pela primeira vez relatou a presença de indivíduos supostamente híbridos, oriundos do cruzamento natural entre *S. romanzoffiana* (na época *Cocos romanzoffiana* Cham.) e *B. odorata* (na época *Cocos pulposa* Barb. Rodr.), na ilha Del Padre, no Uruguai, fazendo uma primeira descrição morfológica comparativa.

Apesar da hibridização entre essas duas espécies ocorrer de forma natural em áreas onde são simpátricas, na Europa, esses híbridos estavam sendo produzidos de forma artificial. No final do século XIX, por exemplo, o viveirista francês Paul Nabonnand já havia realizado a hibridização entre *S. romanzoffiana* (na época *Arecastrum romanzoffianum australe* Beccari) e *B. odorata* (na época *Butia capitata* var. *pulposa* Beccari).

Na obra de Proschowsky (1921), além da descrição morfológica comparativa do híbrido com seus parentais, sua nomenclatura foi pela primeira vez sugerida. O autor propôs nomear o híbrido de Nabonnand como *Butiarecastrum nabonnandi*, criando um notogênero, juntando os nomes dos parentais e dedicando o epíteto específico ao seu criador (Tournay, 2009). Mais tarde, para atender às normas do Código Internacional de Nomenclatura Botânica, o híbrido foi renomeado ×*Butiarecastrum nabonnandii* (Moore, 1982).

No Brasil, o primeiro relato de uma suposta hibridização natural entre essas duas espécies consta no trabalho de Burret (1940), cujo autor e na época professor do Jardim Botânico de Berlim em passagem pelo Brasil, analisou fotos de uma palmeira de ocorrência natural na cidade de Porto Alegre, estado do Rio Grande do Sul (RS). O autor observou que o espécime apresentava um misto de caracteres morfológicos vegetativos e reprodutivos de *S. romanzoffiana* (na época *Arecastrum romanzoffianum* (Cham.) Beccari) e de *B. odorata* (na época *Butia capitata* (Mart.) Beccari), e supôs tratar-se de um híbrido entre esses dois táxons. Apesar de já batizado, nesta obra o autor não se referiu ao suposto híbrido por meio do nome científico, supostamente por desconhecimento da obra de Proschowsky (1921).

Com as atualizações na nomenclatura científica, o gênero *Arecastrum* (Drude) Beccari foi posteriormente substituído por *Syagrus*, e o botânico Vorster alterou o gênero do híbrido para *Butyagrus*, definindo ×*Butyagrus nabonnandii* (Proschowsky) Vorster como a nomenclatura oficial (Vorster, 1990). Nessa obra, Vorster também indicou o lectótipo (Fig. 1), uma vez que o exemplar tipo não foi mencionado na publicação de Proschowsky (1921).

Posteriormente, ×*Butyagrus nabonnandii* teve sua morfologia externa mais bem detalhada em Noblick (2010) e em Soares *et al.* (2014a). Recentemente, Rosa *et al.* (2023) apresentaram descritores morfológicos inéditos para este híbrido, fazendo uma análise morfométrica comparativa entre ele e

seus parentais, abrangendo quatro populações naturais, bem como avaliaram a variação fenotípica interpopulacional e o processo germinativo do híbrido.



Figura 1. Lectótipo de $\times B. nabonnandii$ (Prosch.) Vorster, fruto de cruzamento artificial.
Fonte: Proschowsky (1921)

1.4.1 Relatos de ocorrência e registro de $\times B. nabonnandii$ no Rio Grande do Sul (RS)

No estado do Rio Grande do Sul (Brasil), foi relatada a ocorrência natural de $\times B. nabonnandii$ em pelo menos 11 municípios (Fig. 2). A maioria dos relatos foi feita de forma informal por profissionais que conhecem esse híbrido. Na literatura, entretanto, constam os registros em Pelotas (Noblick, 2010), São Vicente do Sul (Soares *et al.*, 2014a; Rosa *et al.*, 2023), Venâncio Aires (Oliveira-Neves *et al.*, 2022; Rosa *et al.*, 2023), Cachoeira do Sul (Rosa *et al.*, 2023), Manoel Viana (Rosa *et al.*, 2023) e Porto Alegre (Burret, 1940; Rosa *et al.*, 2023).

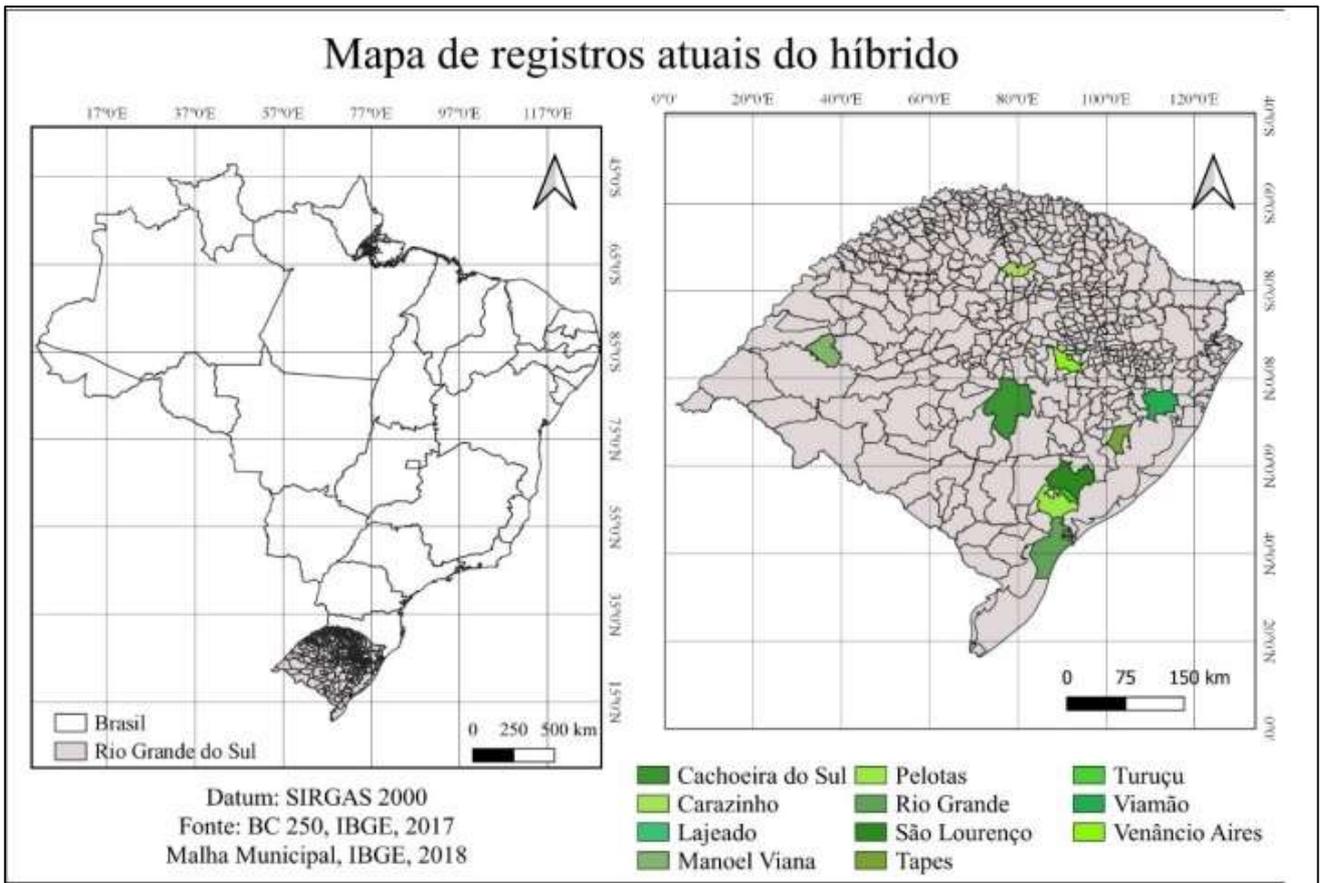


Figura 2. Municípios do estado do Rio Grande do Sul (Brasil) onde a ocorrência de *×Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster foi relatada e registrada. Fonte: Autores.

1.5 Implicações da anatomia foliar em *Arecaceae*

Tomlinson (1961) destacou a importância da anatomia foliar na identificação de palmeiras. Neste sentido, a anatomia foliar não somente tem sido uma ferramenta útil taxonomicamente, como também tem sido usada para sugerir relações sistemáticas em *Arecaceae*.

Dentro dessa família, os trabalhos anatômicos envolveram especialmente a subfamília *Arecoideae*, contemplando as tribos *Cocosae* (Noblick, 2013, 2017b; Noblick *et al.*, 2014; Firmo *et al.*, 2021; Noblick & Sant'Anna-Santos, 2021; Sant'Anna-Santos, 2021; Martins *et al.*, 2015; Defaveri *et al.*, 2015; Pinedo *et al.*, 2016; Sant'Anna-Santos *et al.*, 2015, 2018, 2023a, 2023b, 2023c; Vianna *et al.*, 2017; Vianna, 2017), a tribo *Euterpeae* (Silva & Potiguara, 2008), e a tribo *Iriarteeae* (Kikuchi *et al.*, 2016).

Cabe destacar também os estudos de Noraini *et al.* (2012) e Silva & Lemos (2020) envolvendo a subfamília *Phoeniceae*, ambos com foco na tribo *Trachycarpeae*; e o trabalho de Sanín & Galeano (2011) com a subfamília *Ceroxyloideae*, tribo *Ceroxyleae*. Na subfamília *Calamoideae*, Guevara *et al.* (2011) foram capazes de distinguir os três gêneros da subtribo *Mauritiinae* (tribo *Lepidocaryeae*), sem

contudo, conseguirem separar as espécies usando a anatomia da pina.

Em particular na tribo Cocoseae, foco do presente estudo, e considerando especialmente os gêneros *Butia* e *Syagrus*, a anatomia vem se mostrando cada vez mais útil na circunscrição de espécies dentro desses dois táxons, sendo uma ferramenta tão importante quanto à morfologia vegetal. Glassman (1979) conseguiu separar, com base em caracteres anatômicos da pina, algumas espécies de *Butia* então classificadas dentro de *Syagrus* (Glassman 1970), reconsiderando-o como um gênero válido.

Caracteres anatômicos da pina e morfológicos reprodutivos (bráctea peduncular e posição dos poros no endocarpo) se mostraram relevantes para transferir duas espécies de *Syagrus* (*S. campicola* e *S. leptospatha*) para *Butia* (Noblick 2004, 2006). Mais tarde, de acordo com caracteres morfológicos, como tamanho e formato do endocarpo, Noblick (2010) diferenciou *B. capitata* de *B. odorata*, cuja separação foi corroborada posteriormente por dados anatômicos obtidos por Sant’Anna-Santos *et al.* (2015).

Novamente a anatomia foliar foi considerada na descrição de novas espécies de Arecaceae, a exemplo do trabalho recente de Sant’Anna-Santos (2021), que descreveu uma nova espécie de *Butia*, *B. buenopolensis* B. F. Sant’Anna-Santos; de uma nova espécie de *Syagrus*, *S. carvalhoi* B. F. Sant’Anna-Santos (Sant’Anna-Santos *et al.* 2023a); além de definir um novo status e nova combinação de *Syagrus*, *S. cabralensis* (Noblick & Lorenzi) B. F. Sant’Anna-Santos (Sant’Anna-Santos *et al.* 2023b).

1.6 Implicações da biologia molecular na taxonomia

Estudos taxonômicos vêm utilizando diferentes ferramentas complementares como a morfologia, bioquímica e genética, agregando informações para fazer inferências a respeito dos táxons estudados (Zolet *et al.*, 2013). No que tange à biologia molecular, o atual sistema de classificação botânica, o APG (Grupo de Filogenia de Angiospermas), lança mão dessa ferramenta para classificar ordens e famílias das plantas com flor, que teve sua primeira versão publicada em 1998 e está na sua quarta versão (APG IV, 2016). Esse sistema representa importantes avanços metodológicos e conceituais para classificação das espécies e grupos, principalmente pelo método não se limitar à classificação, possibilitando investigações acerca dos padrões de relacionamento entre as espécies e suas relações evolutivas (Judd *et al.*, 2009).

A biologia molecular vem sendo muito útil em abordagens filogenéticas, onde no passado as filogenias eram baseadas apenas em evidências morfológicas e anatômicas, agora são denominadas “taxonomia integrativa” pela diversidade de áreas que abrange, como a ecologia, química, biologia molecular, ontogenia, bioinformática, na busca de dados mais robustos, os quais podem gerar

evidências mais conclusivas (Chase *et al.*, 2016).

No que tange à identificação de híbridos por meio da biologia molecular, uma ampla gama de marcadores genéticos estão disponíveis baseados em variações do DNA (Gros-Balthazard, 2013). A utilização de marcadores RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) e de isoenzimas são alguns exemplos usados na palmeira do gênero *Phoenix* para diferenciar populações e também supostos espécimes híbridos fruto de cruzamentos interespecíficos (González-Pérez *et al.*, 2004; González-Pérez & Sosa, 2009; Flowers *et al.*, 2019). Outro tipo de marcador que vem sendo utilizado na identificação de híbridos são os marcadores microssatélites (SSR), que são altamente variáveis, e por isso, capazes de tal inferência (Gros-Balthazard, 2013). Os SSR já têm sido amplamente usados na identificação de híbridos de espécies de cultivo, como o arroz (Gealy *et al.*, 2002; Goulart *et al.*, 2011), espécies de *Citrus* (Cristofani *et al.*, 2001) e milho (Grassi *et al.*, 2015).

1.6.1 Utilização da família gênica WRKY em Arecaceae

Proteínas WRKY são fatores de transcrição planta-específicos, compreendendo uma grande família gênica, associados à regulação de respostas a estresses bióticos e abióticos, bem como a outros fatores, como senescência, crescimento vegetal e formação embrionária (Eulgem *et al.*, 2000; Borrone *et al.*, 2004; Zhang & Wang, 2005). Esses fatores de transcrição têm uma sequência de aminoácidos bem preservada, o domínio WRKYGQK, do qual originou seu nome. Os genes WRKY são amplamente e predominantemente distribuídos em plantas, estando ausentes em animais e fungos (Zhang & Wang, 2005).

Em Arecaceae, essa família gênica foi considerada pela primeira vez no trabalho de Mauro-Herrera *et al.* (2006), que desenvolveram 10 marcadores informativos de sequências WRKY de *Cocos nucifera* L., com o intuito de estimar a diversidade genética de variedades de cultivares dessa palmeira de relevante importância econômica. Os resultados foram então apresentados no trabalho de Mauro-Herrera *et al.* (2007), onde mostraram a relevância da família gênica WRKY na avaliação da estrutura populacional desses diferentes cultivares, além de complementar informações geradas por outros marcadores moleculares.

Tendo em vista o sucesso do uso de sequências gênicas WRKY nesses estudos envolvendo Arecaceae, Meerow *et al.* (2009) lançou mão de sete loci WRKY originalmente isolados de *C. nucifera* (Mauro-Herrera *et al.*, 2006), com o objetivo de reconstruir as relações filogenéticas dentro da subtribo Atteleinae (Arecaceae). Posteriormente, considerando a utilidade dos loci WRKY na inferência filogenética nessa família, Merrow *et al.* (2015) ampliaram sua análise filogenética e, utilizando seis loci WRKY, discutiram a evolução de táxons dentro da tribo Cocoseae (Arecaceae), bem como sua

história biogeográfica.

Mais recentemente, com o intuito de construir uma árvore filogenética mais atualizada do gênero *Butia*, marcadores WRKY vêm sendo utilizados em espécies do sul do Brasil (Azambuja *et al.*, em andamento).

1.6.2 Marcadores SNP (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)

Variações por substituição em um único par de nucleotídeos de um determinado gene são chamadas de Polimorfismo de Nucleotídeo Único, do inglês Single Nucleotide Polimorfism (SNP) (Filho *et al.*, 2021).

Segundo Caetano (2009), os marcadores SNP tem como base as alterações mais elementares da molécula de DNA, ou seja, mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas (Adenina, Citosina, Timina e Guanina), que podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória, porém, na maior parte das vezes são encontrados em espaços intergênicos, sem função determinada.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Avaliar a origem híbrida de \times *Butyagrus nabonnandii* por meio de análises anatômicas e moleculares, inferindo se a anatomia vegetal e a biologia molecular correspondem a ferramentas taxonomicamente úteis.

2.2 ESPECÍFICOS

- Descrever a anatomia foliar de \times *B. nabonnandii*, verificando se o seu arranjo anatômico é útil na sua identificação e diferenciação de seus parentais;

- Testar a eficiência de métodos de preservação e de maceração de materiais biológicos na extração de DNA genômico de \times *B. nabonnandii*, avaliando quali-quantitativamente o DNA obtido;

- Inferir a possibilidade de identificação de híbridos entre *Butia odorata* e *Syagrus romanzoffiana* por meio de análises de sequências gênicas da família WRKY.

3 MANUSCRITO 1

Manuscrito submetido à Revista Rodriguésia (ID ROD-2023-0105).

Leaf anatomy of ×*Butyagrus nabonnandii* (Arecaceae) as a tool for its identification

Autores

Patrícia de Oliveira-Neves, ORCID: [0000-0001-5729-1599](https://orcid.org/0000-0001-5729-1599), Universidade Federal do Pampa, Rua Aluizio Barros Macedo, s/n, BR 290 – Km 423, São Gabriel-RS, Brazil;

Bruno Francisco Sant’Anna-Santos, ORCID: [0000-0002-8327-2081](https://orcid.org/0000-0002-8327-2081), Universidade Federal do Paraná, Laboratório de Anatomia e Biomecânica Vegetal, Departamento de Botânica Avenida Coronel Francisco H. dos Santos, 100, Jardim das Américas, Curitiba, Paraná 81531-980, Brazil;

Lurdes Zanchetta da Rosa, ORCID: [0000-0003-4911-9670](https://orcid.org/0000-0003-4911-9670), Universidade Federal do Pampa, Rua Aluizio Barros Macedo, s/n, BR 290 – Km 423, São Gabriel-RS, Brazil;

Antônio Batista Pereira, ORCID: [0000-0003-0368-4594](https://orcid.org/0000-0003-0368-4594), Universidade Federal do Pampa, Rua Aluizio Barros Macedo, s/n, BR 290 – Km 423, São Gabriel-RS, Brazil.

Abstract

Anatomical studies of the leaf blade have been used to complement the morphological data and aid circumscription and identification in Arecaceae. The hybrid palm \times *Butyagrus nabonnandii* results from the natural cross between *Butia odorata* and *Syagrus romanzoffiana*. This study aimed to verify if the leaf anatomy can help identify the hybrid and differentiate it from the parental *taxa*. Samples from the middle portion of the pinnae were collected and subjected to the usual techniques for light microscopy. Three portions of the pinnae were sampled: margin, intermediate region, and midrib. The main characteristics considered were the arrangement of non-vascular fibre bundles and vascular bundles. Pinnae anatomy proved to be useful in the identification of \times *B. nabonnandii*, because it showed a unique pattern, highlighting the importance of leaf anatomy in differentiating the hybrid from parental *taxa*. The three regions proved useful, but the midrib presented more diagnostic characters than the margin and intermediate regions. The pinnae anatomy of the hybrid was a mixture of parental *taxa*'s characters, similar to the external morphology.

Key words: *Butia*; hybrid palm; plant anatomy; *Syagrus*; taxonomy.

Resumo

Estudos anatômicos da lâmina foliar têm sido usados para complementar os dados morfológicos e ajudar na circunscrição taxonômica em Arecaceae. A palmeira híbrida \times *Butyagrus nabonnandii* é o resultado de cruzamento natural entre *Butia odorata* e *Syagrus romanzoffiana*. Objetivou-se verificar se a anatomia foliar pode ajudar na identificação do híbrido, bem como diferenciá-lo dos *taxa* parentais, ajudando em possíveis dúvidas sobre a identificação taxonômica envolvendo esses três *taxa*. Amostras da porção mediana da pinas foram coletadas e sujeitas a técnicas usuais para microscopia óptica. Três regiões da pina foram amostradas: margem, região intermediária e nervura central. O arranjo das fibras e feixes vasculares foram os principais caracteres considerados. Anatomia da pina provou ser útil na identificação de \times *B. nabonnandii*, porque mostrou um padrão único, o que prova a ajuda da anatomia foliar na diferenciação do híbrido dos *taxa* parentais. As três regiões provaram ser úteis, mas a nervura central apresentou mais caracteres diagnósticos em comparação à margem e região intermediária. A anatomia do híbrido revelou um misto de caracteres de ambos os parentais, da mesma maneira como é observado na morfologia externa.

Palavras-chave: *Butia*; palmeira híbrida; anatomia vegetal; *Syagrus*; taxonomia.

Introduction

Arecaceae comprises five subfamilies, 181 genera, and approximately 2600 species concentrated in tropical and subtropical regions (Asmussen *et al.* 2006; Baker & Dransfield 2016). In Brazil, there are 87 genera and 388 species (Soares *et al.* 2023). In Rio Grande do Sul State, five genera are recognised, with 15 species and two natural hybrids (Soares *et al.* 2014a).

In Arecaceae, interspecific crosses are common, as those between species of the *Syagrus* genus, with 11 natural hybrids already documented in Brazil (Glassman 1970; Noblick 2012; Soares *et al.* 2014b; Soares & Assis 2015; Noblick 2017a). However, natural hybrids from intergeneric crosses are rare. These intergeneric hybrids originate from the cross between *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman. and a species belonging to the *Butia* genus, creating the nothogenus \times *Butyagrus* Vorster. In Brazil, three nothospecies were recorded: \times *B. nabonnandii* (Prosch.) Vorster, \times *B. alegretensis* K. Soares, and \times *B. paranaensis* Engels, T. A. Meyer & K. Soares. The first two nothospecies are endemic to Rio Grande do Sul, while the third occurs in the central southern region of the Paraná State (Noblick 2010; Soares *et al.* 2014a; Engels *et al.* 2021; Oliveira-Neves *et al.* 2022; Rosa *et al.* 2023).

Leaf anatomy has been useful in identifying several Arecaceae species and to infer systematic relationships within the family (Silva & Potiguara 2008; Sanín & Galeano 2011; Noraini *et al.* 2012; Noblick 2013, 2017b, 2018; Sant'Anna-Santos *et al.* 2015, 2018, 2023a, 2023b, 2023c; Martins *et al.* 2015; Defaveri *et al.* 2015; Kikuchi *et al.* 2016; Pinedo *et al.* 2016; Vianna 2017; Vianna *et al.* 2017; Silva & Lemos 2020; Firmo *et al.* 2021; Noblick & Sant'Anna-Santos 2021; Sant'Anna-Santos 2021). An example of leaf anatomy's importance for Arecaceae taxonomy is *Butia*, first considered a section of *Syagrus* by Glassman (1970). Later, he performed a systematic survey of the leaf anatomy in *Syagrus* (Glassman 1972), which prompted him to reinstate *Butia* as a valid genus (Glassman 1979).

Over the years, leaf anatomical studies became prominent together with morphological data to evaluate the circumscription in *Butia* (Tomlinson *et al.* 2011; Sant'Anna-Santos *et al.* 2015, 2018; Sant'Anna-Santos 2021; Noblick & Sant'Anna-Santos 2021) and *Syagrus* (Glassman 1970; Leite &

Scatena 2001; Tomlinson *et al.* 2011; Firmo *et al.* 2021; Noblick 2013, 2014, 2017b, 2018; Sant'Anna-Santos *et al.* 2023a; 2023b; 2023c).

×*Butyagrus nabonnandii* is the result of a cross between *B. odorata* (Barb. Rodr.) Noblick and *S. romanzoffiana*, with a natural geographic distribution in the Rio Grande do Sul State (Brazil) and in the southeastern region of Uruguay (Noblick 2010; 2011; Rivas *et al.* 2017; Oliveira-Neves *et al.* 2022; Rosa *et al.* 2023). However, artificially bred specimens of this hybrid have been cultivated in Europe and the USA since the end of the 19th century (Tournay 2009). Currently, the description and identification of this hybrid are based solely on morphological characters (Noblick 2010; Soares *et al.* 2014a; Rosa *et al.* 2023), but leaf anatomy could refine the process.

Therefore, this study aimed to verify if the leaf anatomical arrangement in ×*B. nabonnandii* is useful in identifying the hybrid and differentiating it from both parental *taxa*.

Materials and Methods

Specimens of ×*B. nabonnandii*, *B. odorata* and *S. romanzoffiana* were surveyed in the field in five municipalities of Rio Grande do Sul: Venâncio Aires, Porto Alegre, Cachoeira do Sul, Manoel Viana and São Vicente do Sul (Fig. 1). Vouchers were deposited in the Bruno Edgar Irgang Herbarium (HBEI) at the Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA). Complete voucher information is available as supplementary material (Tab. S1). Specimens of the hybrid representative of each municipality evaluated are shown in Figure 2.

Leaf samples for anatomical analysis were collected from five specimens of *B. odorata* and *S. romanzoffiana* at each municipality and a total of 17 specimens of ×*B. nabonnandii*. For the anatomical data, the pinnae were sampled from the middle of the leaves and sectioned into three portions: leaf margin, midrib portion, and the intermediate region between the former and the latter (Firmo *et al.* 2021). The previously collected dried samples were subjected to a herborisation reversion process adapted from Meira & Martins (2003), then softened according to Firmo *et al.* (2021). Next, they were

dehydrated and stored in 70% ethyl alcohol. After that, the samples were freehand-sectioned with a disposable razor blade following Firmo *et al.* (2021). The microscopic features were measured and examined by bright-field microscopy using an Axio Imager A2 microscope (Carl Zeiss, Germany) equipped with Axiocam MRc (Carl Zeiss, Germany) and the ZEN 2 v 4.0 software. The distribution of the three sampled *taxa* was mapped using QGIS v.3.10.13 (QGIS.org 2020), and municipalities data were taken from IBGE (2018).

The qualitative anatomical characters examined in the present study follow Glassman (1972), Noblick (2013, 2017b), and Noblick & Sant'Anna-Santos (2021). For the pinnae margin and intermediate region, the following characteristics were analysed: (1) vascular bundles with exaggerated fibrous sheath; (2) vascular bundles arrangement and location in the mesophyll; and (3) location and size of non-vascular fibre bundles (henceforth fibre bundles). For the midrib, the following characteristics were analysed: (1) shape; (2) number of collateral bundles; (3) connection to the hypodermis, (4) abaxial projection of the fibrous ring (MFR); (5) accessory bundles partially or completely surrounding the MFR; and (6) expansion tissue. The terminology adopted here for leaf anatomical descriptions follows Noblick (2013a, 2017b) for the margin and Glassman (1972) and Firmo *et al.* (2021) for midrib and intermediate regions.

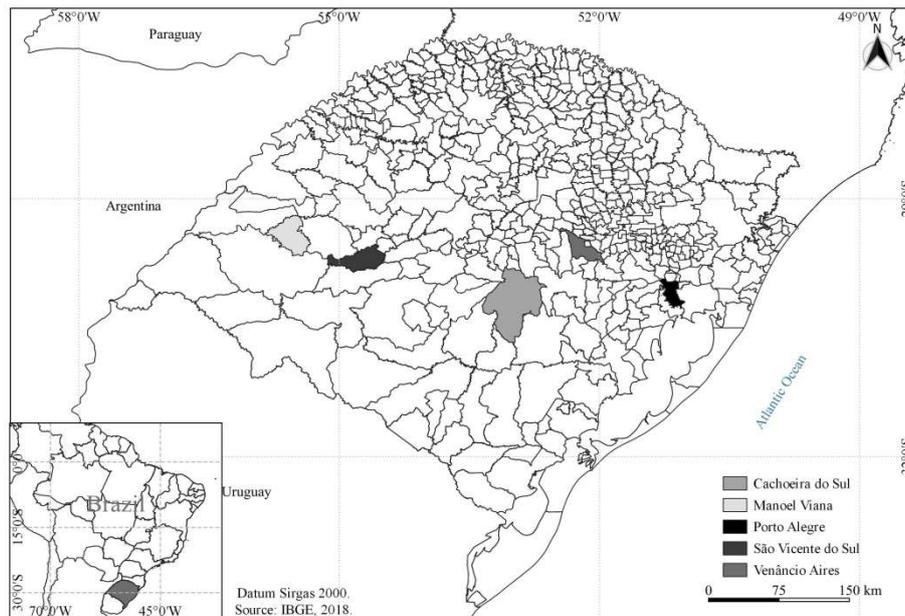


Figure 1 - Distribution maps of the specimens sampled of \times *Butyagrus nabonnandii*, *Butia odorata* and *Syagrus romanzoffiana* in Rio Grande do Sul State, Brazil.

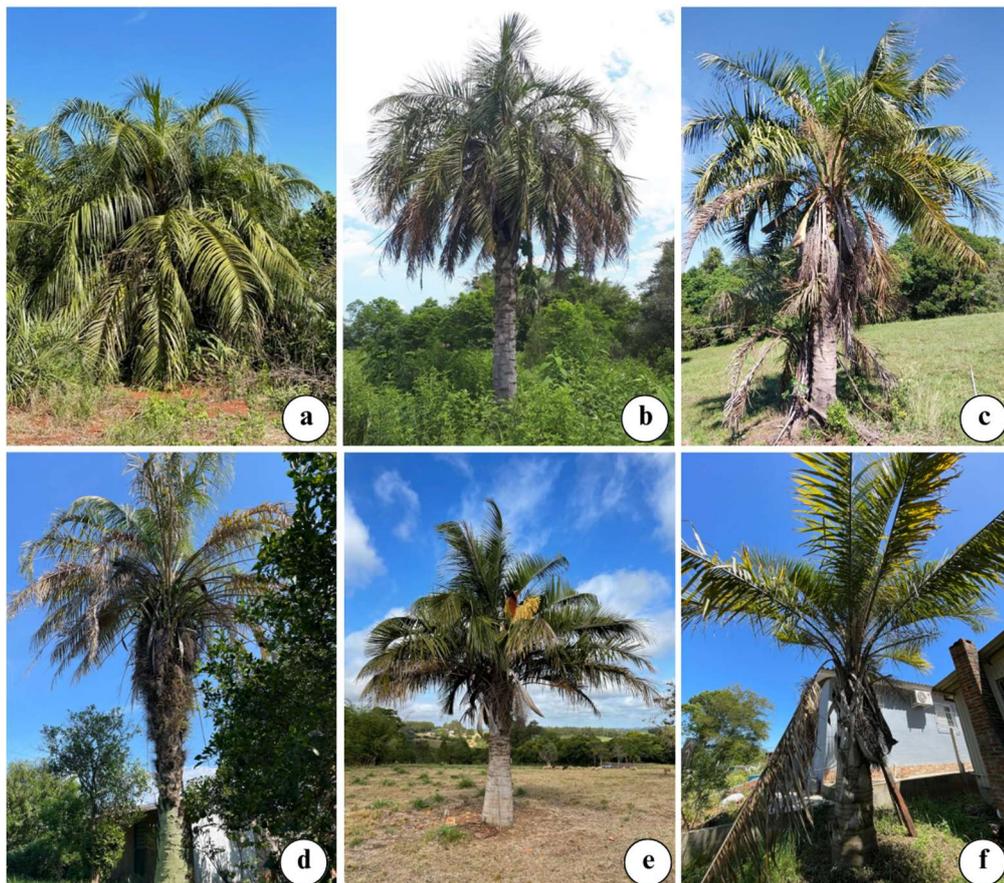


Figure 2 – a-f. General view of representatives of \times *B. nabonnandii*. a-b. collected in Venâncio Aires; c. collected in Porto Alegre; d. collected in São Vicente do Sul; e. collected in Cachoeira do Sul; f. collected in Manoel Viana. Rio Grande do Sul State, Brazil.

Results and Discussion

Intermediate region

Two patterns of arrangement of fibre bundles and vascular bundles were observed in $\times B.$ *nabonnandii*. The more common is pattern 1, which is characterised by the fibre bundles attached to the adaxial hypodermis, tertiary vascular bundles attached to both surfaces (adaxial and abaxial) and rare minute fibre bundles (Fig. 3a). Pattern 2 is characterised solely by tertiary vascular bundles attached to both surfaces (Fig. 3b).

The vascular arrangement in *B. odorata* is clearly mirrored because the vascular bundles on the adaxial side are more or less reflected on the abaxial side (Fig. 3c), as shown by Sant'Anna-Santos *et al.* (2018) and also observed in other *Butia* species (Noblick 2014). In specimens of *B. odorata* studied here, the abaxial surface possesses, near the primary vascular bundles, smaller tertiary vascular bundles, which are not attached to the hypodermis (Fig. 3c), corroborating previous descriptions (see Sant'Anna-Santos *et al.* 2015, 2018; Noblick & Sant'Anna-Santos 2021).

In *Syagrus*, the presence and relative abundance of fibre bundles on adaxial and abaxial surfaces were some of the criteria Glassman (1972) used to separate groups within *Syagrus*. For example, *S. romanzoffiana* is characterised by the presence of fibre bundles attached only to the adaxial hypodermis (Glassman 1972; Noblick 2013, 2017b) (Fig. 3d). On the abaxial surface, *Syagrus* has the same pattern observed in the hybrid, where minute fibre bundles and tertiary vascular bundles are observed (Glassman 1972; Noblick 2013, 2017b, 2018; Firmo *et al.* 2021; Sant'Anna-Santos *et al.* 2023a, 2023b), and observed in *S. romanzoffiana* (Fig. 3d).

The fibre and vascular bundles arrangement of $\times B.$ *nabonnandii* is easily distinguishable from the parental *taxa* but is a mixture of both species. Pattern 1 (Fig. 3a) shows this mixture of both parents' characteristics, while pattern 2, seen in Figure 3b, excludes a possible *Butia* specimen due to the lack of a typical mirrored arrangement.

Margin

In *B. nabonnandii*, it was observed only one tertiary vascular bundle with exaggerated fibrous sheath in the margin (Fig. 3e-f) and variation in the shape of the margin in transverse sections: quadrangular (Fig. 3e) and deltoid (Fig. 3f).

According to Sant'Anna-Santos *et al.* (2018), some specimens of *Butia* simultaneously have deltoid and quadrangular margins, showing that this character is unreliable. However, the *Butia odorata* specimens analysed in the present study always showed a quadrangular margin with two tertiary bundles; the abaxial bundle has an exaggerated fibrous sheath compared to the adaxial bundle (Fig. 3g).

Pinnae margin has identified *Syagrus* species effectively, showing variations in anatomical patterns (Noblick 2013, 2017b; Noblick *et al.* 2014). Noblick (2013) developed an identification key based solely on anatomical characters of the pinnae margin for acaulescent *Syagrus* species because morphology alone could not identify certain species complexes. Noblick (2017b) discussed this variation in *taxa* of wide geographic distribution, such as *Syagrus glazioviana* Becc. This author hypothesised that these differences could either represent intraspecific variation or mean that the species is, in fact, a complex of several closely related unresolved species. However, as shown by Sant'Anna-Santos *et al.* (2023b) in *Syagrus carvalhoi* B.F. Sant'Anna-Santos, a narrow endemic could also show this variation. In *S. romanzoffiana*, for example, two patterns were observed by Noblick (2017b): the first in specimens collected in Brazil and the second in specimens collected in Paraguay. The *S. romanzoffiana* specimens studied here are similar to the specimens from Paraguay studied by Noblick (2017b), where the margin has a quadrangular shape and has only a single tertiary bundle with exaggerated fibrous sheath (Fig. 3h). This might be explained by greater proximity of the collection areas of the present study to the territory of Paraguay. *Syagrus romanzoffiana* is one of the most widely distributed species in South America and is known to be polymorphic in response to differences in soil and altitude, which has been widely discussed in the literature (Noblick 2017a).

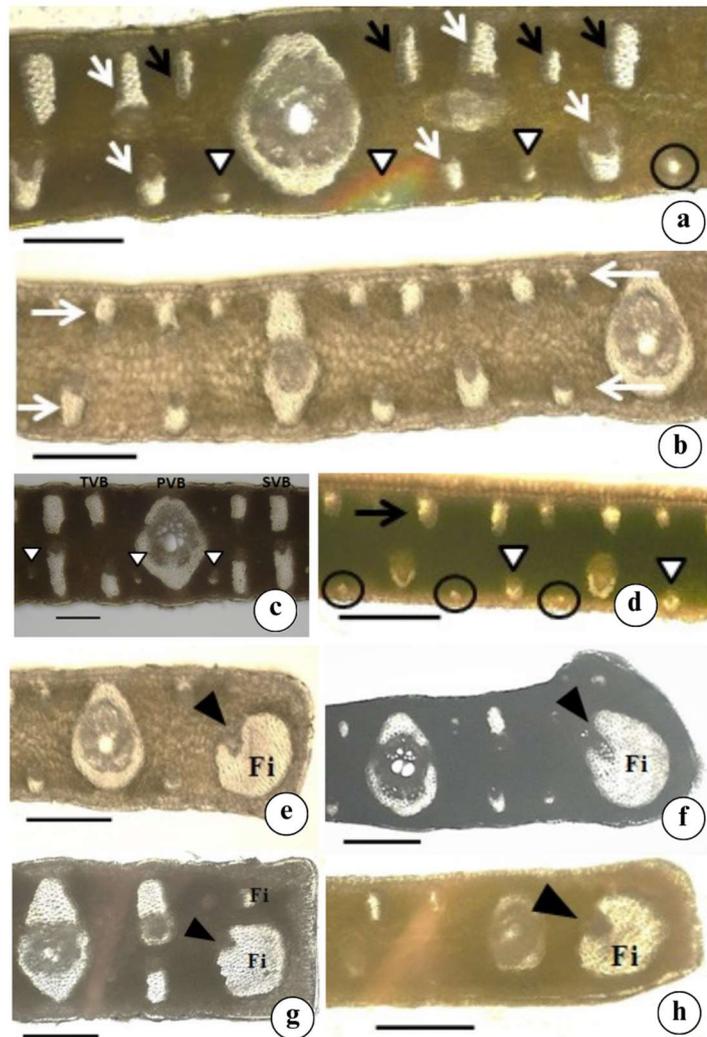


Figure 3 – a-b, e-f. Pinnae anatomy of \times *Butyragrus nabonnandii*; c, g. *Butia odorata*; d, h. *Syagrus romanzoffiana* under light microscopy (transverse sections); a-d. Intermediate region; e-h. Margin; a-b. Pattern 1 and 2 of fibre and vascular bundles arrangement, respectively; c. Mirrored anatomy; d. Non-mirrored anatomy; e, g-h. Quadrangular shape; f. Deltoid shape; Tertiary vascular bundles (white arrows); fibre bundles on the adaxial surface (black arrows); minute vascular bundles (white arrowheads); fibres on the abaxial surface (black circles); vascular bundle with an exaggerated fibrous sheath in the leaf margin (black arrowheads). Fi, fibres; PVB, primary vascular bundle; SVB, secondary vascular bundle; TVB, tertiary vascular bundle. Scale bars: 200 μ m.

Midrib

In \times *B. nabonnandii*, the midrib is truncate, ranging from less (Fig. 4a) to more vertically elongated (Fig. 4b). The main vascular system is composed of 4 to 10 collateral bundles (Fig. 4a-b) and is surrounded by a continuous fibrous ring, projected abaxially and not connected to the abaxial hypodermis. Moreover, accessory vascular bundles around the fibrous ring are present, surrounding it completely (Fig. 4a) or not (Fig. 4b), and at least one has an exaggerated fibrous sheath. In addition,

non-vascular fibres surround the fibrous ring and can also be present in the expansion tissue. The expansion tissue is interrupted and is formed by three (Fig. 4a) to four (Fig. 4b) layers of expansion cells.

Butia odorata and *S. romanzoffiana* midribs present some similarities when compared to \times *B. nabonnandii*. The main similarities are the midrib shape, number of collateral bundles in the midrib main vascular bundle (more than three), continuous fibrous ring and an interrupted expansion tissue (Fig. 4c-d).

In *B. odorata*, fibre bundles around the fibrous ring and in the expansion tissue were absent (Fig. 4c). Only accessory bundles surrounding completely the fibrous ring were observed, with two of them showing sclerenchymatic sheath reinforcement in the adaxial surface (Fig. 4c). This last character is an important taxonomic character for *Butia* as shown by Sant'Anna-Santos *et al.* (2018). In general, the presence of non-vascular fibres around the fibrous ring and in the expansion tissue was not observed in *Butia* (Sant'Anna-Santos *et al.* 2015, 2018; Sant'Anna-Santos 2021; Noblick & Sant'Anna-Santos 2021). The midrib is useful for the *Butia* taxonomy (Glassman 1972; Sant'Anna-Santos *et al.* 2015, 2018; Noblick & Sant'Anna-Santos 2021; Sant'Anna-Santos 2021).

In *Syagrus*, the midrib also showed important diagnostic characters for distinguishing species (Glassman 1972; Firmo *et al.* 2021; Sant'Anna-Santos *et al.* 2023a, 2023b). In Firmo *et al.* (2021), e.g., the authors suggested the existence of a fourth new taxon for the genus, recently described in Sant'Anna-Santos *et al.* (2023c). In *S. romanzoffiana* specimens analysed here, non-vascular fibres were observed only around the fibrous ring and in the expansion tissue (Fig. 4d). In several species of *Syagrus*, the presence of non-vascular fibres in the midrib is a common feature, according to other authors (Glassman 1972; Firmo *et al.* 2021; Sant'Anna-Santos 2023a, 2023b, 2023c). However, to our knowledge, this is the first report of *S. romanzoffiana*'s midrib anatomical structure with images.

The comparative description of the anatomical characters from the intermediate region, margin, and midrib of *S. romanzoffiana*, *B. odorata* and \times *B. nabonnandii* are shown in Table 2.

Pinnae anatomy proved to be useful in the identification of the hybrid \times *Butyagrus nabonnandii* and also differentiate it from both parental *taxa*. In addition to the morphological aspects, the recognition of a hybrid individual in areas where *Butia* and *Syagrus* are sympatric, and even of specimens deposited in herbaria, can be done using an easy and fast method of leaf anatomy analysis. The three regions proved to be useful, but the midrib presented more diagnostic characters in comparison with margin and intermediate region. The pinnae anatomy of the hybrid revealed a mix of characters of both parental *taxa*, of the same way as is observed in the external morphology.

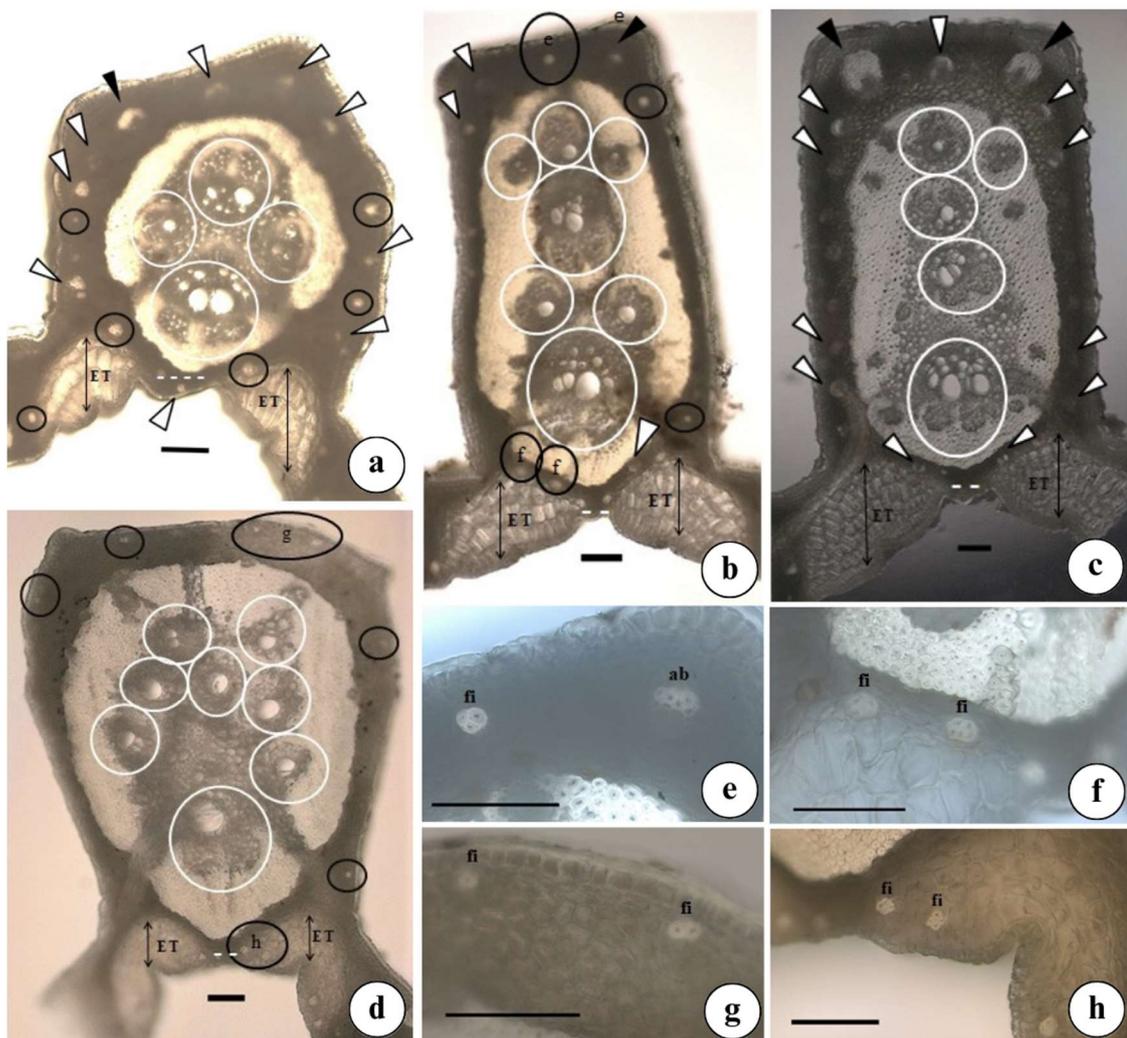


Figure 4 – a-d. Transversal sections of midrib region under light microscopy – a-b, e-f. \times *Butyagrus nabonnandii*; c. *Butia odorata*; d, g-h. *Syagrus romanzoffiana*; a-c. accessory bundles around the fibrous ring (white arrowheads); vascular bundles with sheath reinforcement (black arrowheads); a-b, d. nonvascular fibers around the fibrous ring and in the expansion tissue (ET) (black circles); a-d. expansion tissue interrupted (dotted white line); collateral bundles in the main vascular system (white circles); e. Detail of b: nonvascular fiber (fi); accessory bundle (ab) with sheath reinforcement; f. Detail of b: nonvascular fiber (fi); g-h. Detail of d: nonvascular fiber (fi). Scale bars: 100 μ m.

Table 2 – Pinnae anatomy differences among *×Butyagrus nabonnandii*, *Butia odorata* and *Syagrus romanzoffiana*.

Characters	<i>× B. nabonnandii</i>	<i>B. odorata</i>	<i>S. romanzoffiana</i>
Intermediate Region			
Tertiary vascular bundles on the adaxial surface	Present	Present	Absent
Nonvascular bundles on the adaxial surface	Absent/ Present	Absent	Present
Leaf Margin			
Shape	Deltoid/Quadrangular	Quadrangular	Quadrangular
Number tertiary vascular bundles	1	2	1
Midrib			
Accessory vascular bundles completely surrounding the main vascular system	Absent/ Present	Present	Absent
Number of accessory bundles with exaggerated fibrous sheath	1-2	2	0
Expansion tissue (ET) stratification	3-4	4	4
Fibers around the fibrous ring	Present	Absent	Present

Supplementary material

The following online material is available for this article: Table 1 - Detailed information for each voucher of *×Butyagrus nabonnandii*, *Butia odorata* and *Syagrus romanzoffiana* has been deposited in the Bruno Edgar Irgang Herbarium (HBEI) at the Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA).

Acknowledgements

The authors are thankful to Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPPI, UNIPAMPA) for scientific support, the Laboratório de Anatomia e Biomecânica Vegetal from the Universidade Federal do Paraná (LABV–UFPR), the Núcleo de Estudos da Vegetação Antártica (NEVA-UNIPAMPA) for light microscopy analyses, Luiz Fernando Lima Carvalho from Programa de Pós-Graduação em Botânica from UFPR for support with anatomical techniques and Matheus Teixeira Martins for producing the distribution map. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001

References

- Asmussen CB, Dransfield J, Deickmann V, Barfod AS, Pintaud JC & Baker WJ (2006) A new subfamily classification of the palm family (Arecaceae): evidence from plastid DNA phylogeny. *Botanical Journal of the Linnean Society* 151:15-38. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2006.00521.x>
- Baker WJ & Dransfield J (2016) Beyond Genera Palmarum: progress and prospects in palm systematics. *Botanical Journal of the Linnean Society* 182: 207–233. <https://doi.org/10.1111/boj.12401>
- Defaveri ACA, Barros CF, Arruda RCO, Simas NK & Sato A (2015) *Allagoptera arenaria* (Arecaceae): leaf anatomy of a palm from the Brazilian shore. *Brittonia* 67: 336–349. <https://doi.org/10.1007/s12228-015-9384-2>
- Engels ME, Meyer TA & Soares KP (2021) Um novo \times *Butyagrus* (Arecaceae) do Planalto Sul Brasileiro. *Hoehnea* 48: 1-6. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-41/2020>
- Firmo DHT, Santos SA, Perez MEMP, Soffiatti P & Sant'Anna-Santos BF (2021) Reassessing species boundaries in the *Syagrus glaucescens* complex (Arecaceae) using leaf anatomy. *Botany* 99: 379-387. <https://doi.org/10.1139/cjb-2020-0165>
- Glassman SF (1970) A conspectus of the palm genus *Butia* Becc. *Fieldiana, Botany* 32: 127–172.
- Glassman SF (1972) Systematic studies in the leaf anatomy of palm genus *Syagrus*. *American Journal of Botany* 59: 775-788. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1972.tb10152.x>
- Glassman SF (1979) Re-evaluation of the genus *Butia* with a description of a new species. *Principes* 23: 65–79.
- IBGE (2018) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Portal de mapas. Available at <https://portaldemapas.ibge.gov.br/portal>. Access on 13 Apr 2018.
- Kikuchi TYS, Braga ZV & Potiguara RCV (2016). Anatomia foliar de *Socratea exorrhiza* (Mart.) H. Wendl. (Arecaceae). *Biota Amazonica* 6: 73-79. <http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v6n2p73-79>
- Leite KRB & Scatena VL (2001) Anatomia do segmento leaf de espécies de *Syagrus* Mart. (Arecaceae) da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Sitientibus* 1: 3-14.
- Martins RC, Filgueiras TS, Graciano-Ribeiro D & Somavilla NS (2015) A new species of *Allagoptera* (Arecaceae) from the Cerrado of central Brazil. *Phytotaxa*, 197: 115-124. <http://doi.org/10.11646/phytotaxa.197.2.4>
- Meira RMSA & Martins FM (2003) Inclusão de material herborizado em metacrilato para estudos de anatomia vegetal. *Árvore* 27: 109-112. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622003000100015>
- Noblick LR (2010) *Butia*. In: Lorenzi H, Noblick LR, Kahn F, Ferreira E (Eds) *Flora brasileira: Arecaceae (palmeiras)*. Instituto Plantarum, Nova Odessa. 159-184p.
- Noblick LR (2011) Validation of the Name *Butia odorata*. *Palms* 55: 48-49.

- Noblick LR (2012) *Syagrus* × *mirandana*, a naturally occurring hybrid of *Syagrus coronata*. *Palms* 56: 57–60.
- Noblick LR (2013) Leaflet anatomy verifies relationships within *Syagrus* (Arecaceae) and aids in identification. *PhytoKeys* 26: 75–99. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.26.5436>
- Noblick LR (2014) *Butia*: what we think we know about the genus. *The Palm Journal* 208:1–23.
- Noblick LR (2017a) A revision of the genus *Syagrus* (Arecaceae). *Phytotaxa* 294: 1–262. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.294.1.1>.
- Noblick LR (2017b) Key to *Syagrus* identification using leaflet margin anatomy: supplement to “A revision of *Syagrus* (Arecaceae)”. *Phytokeys* 81: 19-43. <https://doi.org/10.3897/phy-tokeys.81.12909>
- Noblick LR (2018) *Syagrus guaratingensis*: a new species from Bahia, Brazil. *Palms* 62: 77-86.
- Noblick LR, Lorenzi H, Souza VC (2014) Four new taxa of acaulescent *Syagrus* (Arecaceae) from Brazil. *Phytotaxa* 188: 1–13. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.188.1.1>
- Noblick LR & Sant’Anna-Santos BF (2021) Diversity of leaf anatomy within a single leaflet and between leaflets of four *Butia* (Arecaceae, Arecoideae) species. *Phytokeys* 180: 31-52. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.180.66018>
- Noraini T, Ruzi AR, Nurnida MK & Hajar, NR (2012) Systematic significance of leaf anatomy in *Johannesteijsmannia* H. E. Moore (Arecaceae). *Pertanika Journal Tropical Agricultural Science* 35: 223-235.
- Oliveira-Neves P, Pereira AB, Cañedo AD, Souza VQ, Laindorf BL, Azambuja MB & Rosa LZ (2022) Análise quali-quantitativa do DNA genômico extraído de folha e estipe de ×*Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster. *Research, Society and Development* 11: e572111033005. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i10.33005>
- Pinedo AS, Martins RC, de Oliveira RC & Gomes SM (2016) Leaflet anatomy in *Allagoptera* (Arecaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 182: 361–375. <http://doi.org/10.1111/boj.12439>
- QGIS.org (2020) QGIS Geographic Information System. QGIS Association. Available at <http://www.qgis.org>.. Access on 13 April 2023.
- Rivas M, Filippini JM, Cunha H, Hernández J, Resnichenko Y & Barbieri RL (2017) Palm Forest landscape in Castillos (Rocha, Uruguay): contributions to the design of a conservation area. *Open Journal of Forestry* 7: 97-120. <https://doi.org/10.4236/ojf.2017.72007>
- Rosa LZ, Sant’Anna-Santos BF, Almeida CG, Kuhn SA, Hüther CM & Souza VQ. 2023 ×*Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster (Arecaceae): a sterile and rare palm with variable morphology? *Brazilian Journal of Biology* 83: e271366. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.271366>
- Sanín MJ & Galeano G (2011) A revision of the Andean wax palms, *Ceroxylon* (Arecaceae). *Phytotaxa* 34: 1–64. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.34.1.1>
- Sant’Anna-Santos BF (2021) A new endemic and critically endangered species of *Butia* (Arecaceae)

with comments on morpho-anatomical novelties in the genus. *Plant Systematics and Evolution* 307: 1-16. <https://doi.org/10.1007/s00606-020-01729-w>

Sant'Anna-Santos BF, Carvalho Júnior WG & Amaral VB (2015) *Butia capitata* (Mart.) Becc. lamina anatomy as a tool for taxonomic distinction from *B. Odorata* (Barb. Rodr.) Noblick comb. nov (Arecaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 87: 71–81. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520130457>

Sant'Anna-Santos BF, Santos AS, Nunes ELP, Francino DMT & Carvalho Júnior WGO (2018) Does leaf anatomy aid in species identification of *Butia* (Arecaceae)? *AoB PLANTS*: 1-15. <https://doi.org/10.1093/aobpla/ply046>

Sant'Anna-Santos BF, Azevedo IFP, Micheli R & Soffiatti P (2023a) Morpho-anatomical novelties of a dwarf *Syagrus* (Arecaceae) of canga: implications for ecology, conservation, and taxonomy. *Plant Systematics and Evolution* 309: 8. <https://doi.org/10.1007/s00606-023-01843-5>

Sant'Anna-Santos BF, Micheli R, Carvalho LFL & Soffiatti P (2023b) A new bluish-leaved *Syagrus* (Arecaceae) from an overlooked OCBIL in the Espinhaço Range (Brazil). *Plant Ecology and Evolution* 156: 129-145. <https://doi.org/10.5091/plecevo.101027>

Sant'Anna-Santos BF, Carvalho LFL & Soffiatti P (2023c) A new rupicolous palm from the campos rupestres, Minas Gerais, Brazil. *Edinburgh Journal of Botany* 80: 1-15. <https://doi.org/10.24823/EJB.2023.1974>

Silva RJF & Potiguara RCV (2008) Aplicações taxonômicas da anatomia foliar de espécies amazônicas de *Oenocarpus* Mart. (Arecaceae). *Acta Botanica Brasílica* 22: 999-1014. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062008000400011>

Silva IIC & Lemos JR (2020) Estudo anatômico de *Copernicia prunifera* (Mill.) H. E. Moore (Arecaceae) presente em mancha de caatinga no extremo norte do Piauí. *Pesquisas no Seminário Piauiense* 6: 35-45.

Soares KP, Longhi SJ, Witeck Neto L & Assis LC (2014a) Palms (Arecaceae) from Rio Grande do Sul, Brazil. *Rodriguesia* 65: 113-139. <http://doi.org/10.1590/S2175-78602014000100009>

Soares KP, Assis LC, Guimarães CC & Vieira ARG (2014b). Four new natural hybrid of *Syagrus* from Brazil. *Palms* 58: 87-100.

Soares KP & Assis LC (2015) *Syagrus x cipoensis*, um nouvel hybride du Minas Gerais, Brésil. *Princeps* 1: 115-124.

Soares KP, Lorenzi H, Vianna SA, Leitman PM, Heiden G, Moraes RM, Martins RC, Campos-Rocha A & Sant'Anna-Santos BF (2023) Arecaceae in Flora e Funga do Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Available at <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB53>. Access on 03 March 2023.

Tomlinson PB, Horn JW & Fisher JB (2011) *The anatomy of palms*. Clarendon Press, Oxford, 276p.

Tournay F (2009) The Nabonnand Family and Palms. *Palms* 53: 119-123.

Vianna SA (2017) A new species of *Acrocomia* (Arecaceae) from Central Brazil. *Phytotaxa* 314: 45-54. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.314.1.2>

Vianna SA, Carmelo-Guerreiro SM, Noblick L & Colombo CA (2017) Leaf anatomy of *Acrocomia* (Arecaceae): an additional contribution to the taxonomic resolution of a genus with great economic potential. *Oesterreichische Botanische Zeitschrift* 303: 1-16. <http://doi.org/10.1007/s00606-016-1369-4>

4 MANUSCRITO 2

Manuscrito publicado na Revista Research, Society and Development ISSN 2525-3409
(<https://doi.org/10.33448/rsd-v11i10.33005>)

Análise quali-quantitativa do DNA genômico extraído de folha e estipe de x *Butyragrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster

Quali-quantitative analysis of genomic DNA taken from the leaf and stipe of x *Butyragrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster

Análisis cuali-cuantitativo de ADN genómico extraído de hoja y estípote de x *Butyragrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster

Patrícia de Oliveira Neves

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5729-1599>
Universidade Federal do Pampa, Brasil
E-mail: patricianeves@unipampa.edu.br

Antônio Batista Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0368-4594>
Universidade Federal do Pampa, Brasil
E-mail: batistapereira@unipampa.edu.br

Andrés Delgado Cañedo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8377-620>
Universidade Federal do Pampa, Brasil
E-mail: andrescanedo@unipampa.edu.br

Velci Queiroz de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6890-6015>
Universidade Federal do Pampa, Brasil
E-mail: velcisouza@unipampa.edu.br

Bruna Lucia Laindorf

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9418-2567>
Secretaria de Educação do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil
E-mail: laindorfb@gmail.com

Maike Brum Azambuja

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6674-274X>
Universidade Federal do Pampa, Brasil
E-mail: maikeazambuja.aluno@unipampa.edu.br

Lurdes Zanchetta da Rosa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2885-7212>
Universidade Federal do Pampa, Brasil
E-mail: lurdesrosa.aluno@unipampa.edu.br

Resumo

Ferramentas de identificação baseadas em DNA são de suma importância em estudos genéticos de plantas, onde o isolamento e a purificação são passos cruciais. O objetivo do presente estudo foi testar a eficiência de métodos de conservação e de maceração de materiais biológicos na extração de DNA genômico de folha e estipe de x *Butyragrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster. Os dados foram analisados com ajuda do software Genes via análise de variância, considerando o esquema fatorial 3x2x2x2, com três repetições (três espécimes do híbrido; dois tipos de material biológico, estipe e folha; dois tipos de conservação, fresco e desidratado; dois tipos de maceração, com e sem nitrogênio líquido). As médias foram analisadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro. O DNA genômico foi avaliado por espectrofotometria para determinar a concentração. A integridade foi determinada por eletroforese em gel de agarose. Foram utilizados dois primers da família gênica WRKY para testar a qualidade do DNA obtido em reações de PCR. As análises estatísticas revelaram diferenças significativas nas concentrações de DNA entre os métodos avaliados. Obteve-se maiores quantidades de DNA a partir da extração de folhas frescas quando comparadas às folhas desidratadas. O rendimento do DNA a partir de estipe fresco e desidratado não variou entre os métodos testados. O uso de nitrogênio líquido pode ser dispensado, conforme resultado dos padrões das bandas nas reações de PCR. Foi possível extrair DNA de qualidade e quantidades suficientes dos materiais

biológicos de x *B. naboannandii*, que amplificaram as regiões genômicas de interesse.

Palavras-chave: Arecaceae; Extração de DNA; Nitrogênio líquido; Rendimento do DNA; Palmeira híbrida.

Abstract

DNA-based identification tools are of great importance in plant genetic studies, where DNA isolation and purification are crucial steps. The aim of the present study was to test the efficiency of conservation and maceration methods of biological materials in the extraction of genomic DNA from leaf and stipe of x *Butyagrus naboannandii* (Prosch.) Vorster. The data were analyzed with the help of the software Genes via variance analysis, considering the factorial scheme 3x2x2x2, with three replications (three specimens of the hybrid; two types of biological material – stipe and leaf; two types of conservation – fresh and dehydrated; two types of maceration – with and without liquid nitrogen). The means were analyzed by Tukey test at 5% error probability. Genomic DNA was evaluated by spectrophotometry to determine the concentration. Integrity was determined by agarose gel electrophoresis. Two primers from the WRKY gene Family were used to test the quality of the DNA obtained in PCR reactions. Statistical analyses revealed significant differences in DNA concentrations between the evaluated methods. Higher amounts of DNA were obtained from the extraction of fresh leaves when compared to dehydrated ones. DNA yield from fresh and dehydrated stipe did not vary between the methods tested. The use of liquid nitrogen can be dispensed, as a result of band patterns in PCR reactions. It was possible to extract quality DNA and sufficient amounts of biological materials from x *B. naboannandii*, which amplified the genomic regions of interest.

Keywords: Arecaceae; DNA extraction; Liquid nitrogen; DNA yield; Hybrid palm.

Resumen

Las herramientas de identificación de ADN son de gran importancia en los estudios genéticos de plantas, donde el aislamiento y la purificación son pasos cruciales. El objetivo del presente estudio fue probar la eficiencia de los métodos de conservación y maceración de muestras de hoja y estípote de x *Butyagrus naboannandii* (Prosch.) Vorster en la extracción de ADN genómico. Los datos fueron analizados con el software Genes mediante análisis de varianza, considerando el esquema factorial 3x2x2x2 con tres repeticiones (tres ejemplares del híbrido; dos tipos de material biológico, estípote y hoja; dos tipos de conservación – fresco y deshidratado; dos tipos de maceración – con y sin nitrógeno líquido). Las medias se analizaron por el test de Tukey con 5% de probabilidad de error. El ADN genómico fue evaluado por espectrofotometría para determinar la concentración. La integridad se determinó por electroforesis en gel de agarosa. Se utilizaron dos iniciadores de la familia de genes WRKY para comprobar la calidad del ADN obtenido en reacciones de PCR. Los análisis estadísticos revelaron diferencias significativas en las concentraciones de ADN entre los métodos evaluados. Se obtuvieron mayores cantidades de ADN en la extracción de hojas frescas en comparación con las hojas deshidratadas. El rendimiento de ADN del estípote fresco y deshidratado no varió entre los métodos probados. Se puede prescindir del uso de nitrógeno líquido como resultado de los patrones de bandas en las reacciones de PCR. Fue posible extraer ADN de calidad y cantidades suficientes de material biológico de x *B. naboannandii*, que amplificó las regiones genómicas de interés.

Palabras clave: Arecaceae; Extracción de ADN; Nitrógeno líquido; Rendimento de ADN; Palma híbrida.

1. Introdução

O isolamento e a purificação do DNA são passos cruciais em técnicas moleculares usadas em estudos de plantas para a identificação de genótipos, características econômicas associadas a genes de interesse e diversidade genética (Aboul-Maaty & Oraby, 2019). Ferramentas de identificação baseadas em DNA estão ganhando importância em estudos genéticos de plantas (Hegde et al., 2017), onde o estágio mais importante de qualquer técnica baseada em DNA é conseguir isolar e amplificar o DNA genômico obtido de tecidos vegetais (Mo & Wangsomnuk, 2021).

Tradicionalmente, as folhas são usadas como fonte principal de DNA genômico (Colpaert et al., 2005; Novaes et al., 2009; Aydin et al., 2020). Materiais alternativos, entretanto, como a casca e tecidos do caule, vêm sendo utilizados por serem mais fáceis de serem coletados, especialmente em espécies arbóreas onde a altura das folhas dificulta sua amostragem (Mangaravite et al., 2020).

A extração do DNA do caule de espécies arbóreas é importante devido à dificuldade de obtenção de folhas jovens e sadias de plantas altas (Carvalho et al., 2019). Em Arecaceae, por exemplo, em que algumas espécies apresentam porte muito alto, amostras de tecidos do estipe representam uma alternativa ao uso das folhas, pela facilidade de obtenção desse tipo de material ao nível do solo (Lanes et al., 2017; Carvalho et al., 2019).

Outro aspecto importante no processo de extração de DNA consiste no método de maceração do tecido, que pode afetar a qualidade do DNA obtido. A maioria dos métodos de isolamento de DNA vegetal, incluindo kits comerciais, requer a maceração do material vegetal em nitrogênio líquido, que facilita a trituração da amostra, além de manter o tecido vegetal em baixa temperatura (Ibrahim et al., 2010). Em contrapartida, esse produto não é facilmente acessível em cidades afastadas de grandes centros populacionais, é caro, deve ser armazenado em recipientes especiais (Azêvedo et al., 2019), não sendo apenas perigoso, como também volátil, o que acaba adicionando custo ao experimento (Tan et al., 2013).

No Brasil, a palmeira x *Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster apresenta distribuição geográfica restrita ao estado do Rio Grande do Sul, existindo até o momento, apenas descrições da sua morfologia externa (Barbosa Rodrigues, 1903; Proschowsky, 1921; Burret, 1940; Lorenzi et al., 2010; Soares et al., 2014). Abordagens utilizando ferramentas de biologia molecular, por sua vez, podem contribuir com o conhecimento ainda incipiente dessa palmeira pertencente a uma família botânica tão representativa na biodiversidade brasileira.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi testar a eficiência de métodos de conservação e maceração de materiais biológicos na extração de DNA genômico a partir de tecidos internos do estipe e de folhas de indivíduos adultos de x *B. nabonnandii* para uso em análises moleculares.

2. Material e Métodos

2.1 Coleta do material biológico

Para a análise quali-quantitativa do DNA genômico, foi realizada saída a campo para a coleta de amostras de folhas e de tecidos internos do estipe de três espécimes adultos da palmeira x *B. nabonnandii*, em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 1), pertencentes a uma população encontrada no município de Venâncio Aires, estado do Rio Grande do Sul, Brasil (29° 36' 22" S 52° 11' 40" O). As atividades de laboratório para a realização das extrações de DNA e das análises moleculares foram desenvolvidas no Laboratório de Análises de Ácidos Nucleicos do Centro de Pesquisas Biotecnológicas (CIPBiotec) da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), campus São Gabriel/RS.

Amostras foliares: amostras de folhas dos três espécimes selecionados foram coletadas e armazenadas de forma diferente considerando dois métodos de conservação (material fresco e desidratado), baseados no trabalho de Azêvedo et al. (2019). Para a análise com folhas frescas, essas foram dispostas em embalagens plásticas com fecho tipo “Ziplock” e borrifadas com água para mantê-las hidratadas (Figura 2a). Após, os sacos ficaram acondicionados em caixa térmica de isopor com gelo até o momento da extração do DNA, que ocorreu quatro dias após a coleta. Para a análise da extração a partir de folhas desidratadas, as amostras foram dispostas individualmente dentro de envelopes de papel pardo, que foram acondicionados em embalagens plásticas com fecho tipo “Ziplock”, contendo sílica gel (Figura 2b). A sílica foi substituída de acordo com o indicador de saturação. A extração desse tipo de amostra foi realizada aproximadamente 15 dias após a coleta, quando o material já estava bem desidratado.

Amostras de tecidos do estipe: os métodos para a coleta e armazenagem de tecido interno do estipe se basearam nos trabalhos de Mello et al. (2015) e Mangaravite et al. (2020), respectivamente. Amostras foram coletadas sempre que possível a 1,30 m do solo, por meio de um trado de incremento (Sonda Pressler) (Figura 2c). O material fresco foi estocado em tubo de reação de 1,5 ml, envolto por papel alumínio para evitar contato com a luz (Figura 2d), ficando acondicionado em caixa térmica de isopor com gelo até o momento da extração, que ocorreu em torno de sete dias após a coleta. Para as amostras desidratadas, o procedimento foi o mesmo daquele descrito para as amostras de folhas. Após a perfuração do estipe, o orifício foi protegido com pasta de silicone para dificultar a entrada de microrganismos e permitir a cicatrização do ferimento.

Figura 1. Espécimes de *x Butyragrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster selecionados para o estudo quali-quantitativo. a: espécime em estágio mais inicial de desenvolvimento; b: espécime em estágio intermediário de desenvolvimento; c: espécime em estágio mais avançado de desenvolvimento.



Fonte: Autores.

Figura 2. Métodos de coleta e de conservação das amostras de folha e estipe de *x Butyragrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster. a: folhas frescas, borrifadas com água, acondicionadas em embalagens plásticas; b: envelopes de papel pardo com amostras de folhas, estocados em embalagem plástica com sílica gel; c: coleta de tecidos internos do estipe por meio da Sonda Pressler; d: amostra de estipe sendo estocada em tubo de reação 1,5 ml.



Fonte: Autores.

2.2 Extração e quantificação do DNA genômico

Para a extração do DNA genômico de ambos os materiais biológicos estudados, foi seguido as instruções do protocolo do kit comercial Qiagen Plant MiniKit® (Hilden, Germany), utilizando em torno de 100 mg de folha e estipe desidratados e 150 mg de estipe fresco. A quantidade do DNA isolado foi avaliada no espectrofotômetro NanoVue™ Plus e a integridade foi verificada em eletroforese de gel de agarose 1%, corado com GelRed™ (Biotium^{VR}), visualizado sob luz UV.

No processo de extração foram avaliados dois métodos de maceração, com e sem o uso de nitrogênio líquido, baseados no trabalho de Azêvedo et al. (2019), em que foram incluídos os dois tipos de material biológico (folha e estipe) e os dois estados de conservação (fresco e desidratado).

Todas as amostras, inclusive os materiais processados em nitrogênio líquido, foram maceradas em um almofariz com a ajuda de um pistilo até ficarem moderadamente fracionadas.

2.3 Análise estatística

Os dados foram analisados com ajuda do software Genes (Cruz, 2016) via análise de variância considerando o esquema fatorial 3x2x2x2 com três repetições, isto é: 3 espécimes do híbrido; 2 tipos de material biológico (estipe e folha); 2 tipos de estado de conservação (fresco e desidratado); 2 tipos de maceração (com e sem nitrogênio líquido). Após a identificação das interações significativas, os efeitos foram desmembrados em seus efeitos simples, e as médias analisadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

2.4 Amplificação do DNA genômico

Para amplificação do DNA genômico por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foram utilizados primers correspondentes a sequências gênicas da família WRKY desenvolvidos para *Cocos nucifera* L. (Mauro-Herrera et al., 2006) e adaptadas por Meerow et al. (2009) (Tabela 1). A amplificação de fragmentos de tamanhos esperados foi um parâmetro para determinar a qualidade do DNA genômico compatível com a técnica de PCR.

As reações de PCR foram adaptadas de Laindorf et al. (2019), onde o volume final de cada reação foi de 25 µL, composto por: 2 µL (120-160 ng de folhas frescas; 30-160 ng de folhas desidratadas) e 4 µL (10-30 ng de estipe fresco e desidratado) de DNA genômico; 1 µL (10 pM) de cada primer (*forward* e *reverse*); 1 µL (1 mM) de MgCl₂; 15 µL de HotStarTaq[®] Master Mix Kit Qiagen 2x (2.5 unidades da Taq DNA Polimerase; 1.5 mM MgCl₂; 200 µM de cada dNTP), e água ultrapura (Milli-Q) até completar os 25 µL de reação.

A amplificação foi realizada em um termociclador BIO-RAD C1000 Touch[™], com um passo de desnaturação inicial de 95° C por 15 minutos, seguido por 35 ciclos de 95° C por 30 s para desnaturação, 1 minuto a 61.1° C para anelamento, 1 minuto de extensão a 72° C, e um passo de extensão final a 72° C por 2 minutos.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%, preparados em tampão TBE 1X, corados com GelRed[™] (Biotium[®]) e visualizados sob luz UV. Um marcador de tamanho molecular de 100 pares de bases (Norgen) foi usado para avaliar o tamanho dos produtos de amplificação.

Tabela 1. Sequências de primers utilizadas para amplificar o DNA genômico extraído de folha e estipe de *x Butyragrus nabonandii* (Prosch.) Vorster, correspondentes aos loci WRKY-02 e WRKY-12.

Locus	Sequência do Primer (5' – 3')	Temperatura de anelamento (°C)
WRKY-02	F: ACAATCACCCAGGCTTTCTCA	61.1
	R: ATTCCACAACCCCGATGCTTC	
WRKY-12	F: GGGTGCTCACAACCACTCCA	61.1
	R: TGCCCTCTCCACATGCTTTC	

Fonte: Meerow et al. (2009).

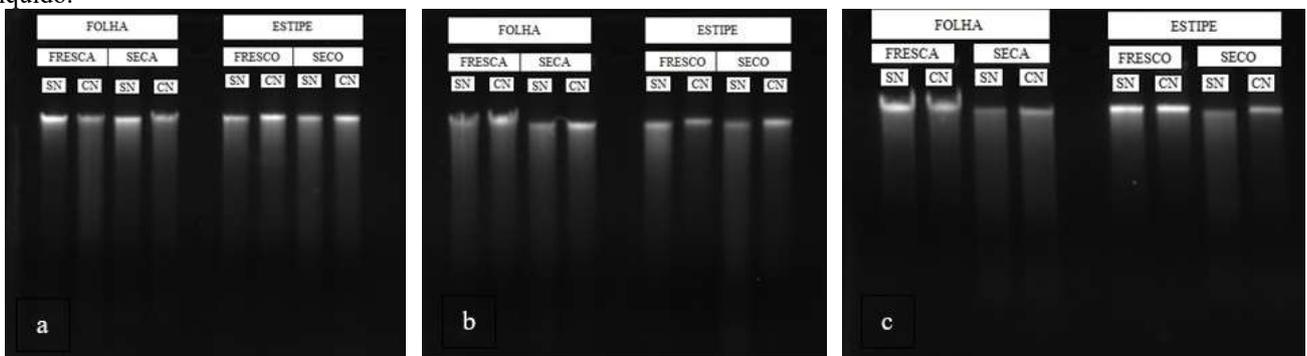
3. Resultados e Discussão

O kit comercial usado no presente estudo se mostrou apto para a extração de DNA de boa qualidade dos materiais biológicos extraídos de *x B. nabonandii*. Para os diferentes métodos de conservação e de maceração, foi possível obter

elevada porcentagem de DNA de alto peso molecular, confirmado pelo padrão observado por eletroforese em gel de agarose (Figura 3).

Com base nos dados obtidos, foi possível identificar que houve interações significativas para todos os fatores analisados, onde os efeitos simples após desmembrados, possibilitaram identificar que, independentemente do método utilizado, foram bem evidentes as diferenças nas concentrações de DNA genômico obtidas (em $\text{ng}/\mu\text{L}$) para folha e estipe de *x B. nabonnandii* (Gráfico 4a). Folhas frescas e desidratadas produziram uma concentração muito superior de DNA em relação ao estipe, com rendimento de 16 vezes e quatro vezes, respectivamente. Essa diferença expressiva nas concentrações de DNA entre folha fresca e estipe também foi observada por Lanes et al. (2013) estudando a palmeira *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Martius, cujo rendimento das folhas foi 4,8 superior ao obtido pelo estipe. Carvalho et al. (2019), entretanto, observaram que não houve diferença estatística entre essas concentrações na palmeira *Euterpe edulis* Mart.

Figura 3. Integridade do DNA genômico obtido a partir dos diferentes métodos de conservação e maceração dos materiais biológicos de *x Butyragrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster. Bandas de alto peso molecular observadas em a (espécime 1), b (espécime 2), c (espécime 3). SN: maceração sem nitrogênio líquido; CN: maceração com nitrogênio líquido.



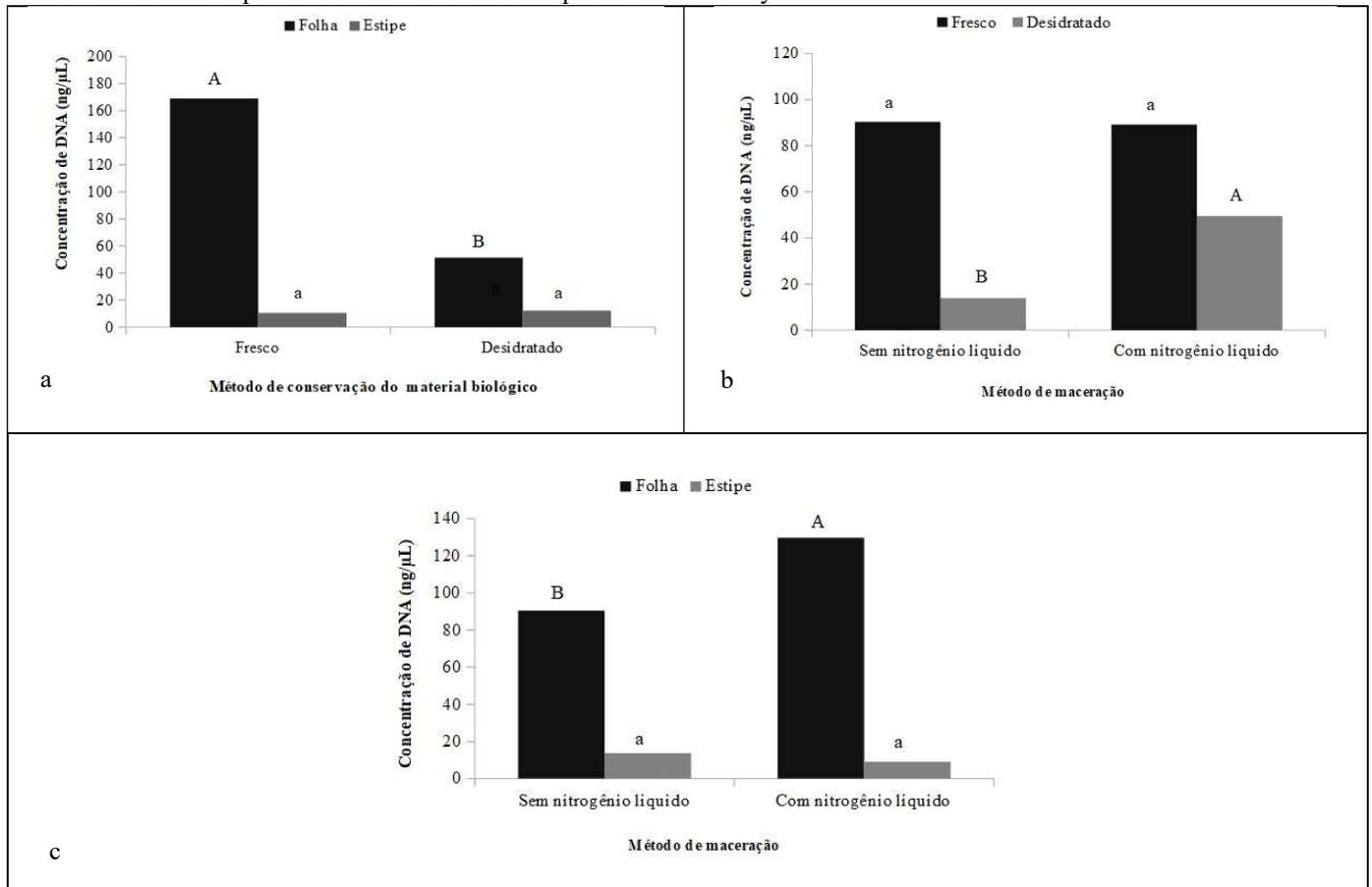
Fonte: Autores.

Quando a análise comparou o material biológico com o método de armazenagem, houve diferenças estatísticas significativas apenas na concentração de DNA obtido a partir do tecido foliar (Gráfico 4a). Folhas frescas permitiram obter três vezes mais DNA (valor médio de $169,03 \text{ ng}/\mu\text{L}$) que as folhas desidratadas (valor médio de $51,25 \text{ ng}/\mu\text{L}$).

Entretanto, a comparação entre os métodos de conservação e de maceração, sem especificar o tipo de material biológico (folha ou estipe), revelou que a concentração de DNA obtida a partir de material fresco não diferiu significativamente com o uso de nitrogênio líquido (Gráfico 4b). Resultados semelhantes foram observados por Furtado Filho et al. (2021) quando compararam cinco diferentes protocolos de extração de DNA a partir de folhas frescas de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O., constatando não haver nenhuma diferença significativa quando usaram nitrogênio líquido na extração.

Quando envolveu material desidratado, por outro lado, a concentração de DNA genômico obtida utilizando nitrogênio líquido na maceração ($49,51 \text{ ng}/\mu\text{L}$) foi quatro vezes superior ao material que não utilizou esse produto ($13,95 \text{ ng}/\mu\text{L}$). O uso de nitrogênio se fez importante especialmente quando o material biológico tratou-se de folha, onde houve diferença estatística significativa, ao contrário do observado para estipe, cuja correlação com o nitrogênio líquido não diferiu entre si (Gráfico 4c).

Gráfico 4. Médias das interações entre as concentrações de DNA extraído de folha e estipe de *x Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster, a partir dos diferentes métodos de conservação e de maceração. Médias seguidas das mesmas letras na coluna correspondente não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.



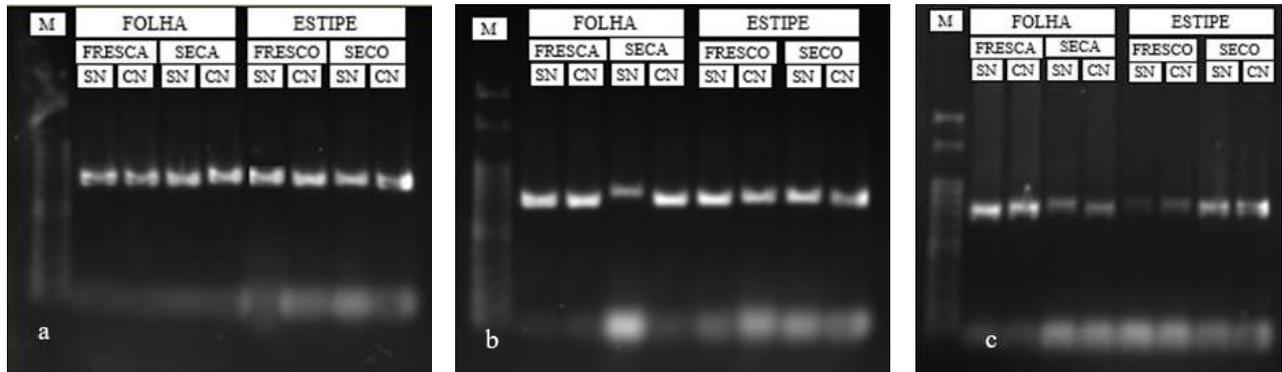
Em que: no gráfico a, letras maiúsculas comparam os efeitos simples da folha com o tipo de conservação; letras minúsculas comparam os efeitos simples do estipe com o tipo de conservação. No gráfico b, letras minúsculas comparam os efeitos simples do material fresco macerado com e sem nitrogênio líquido; letras maiúsculas comparam os efeitos simples do material desidratado macerado com e sem nitrogênio líquido. No gráfico c, letras maiúsculas comparam os efeitos simples de folha macerada com e sem nitrogênio líquido; letras minúsculas comparam os efeitos simples do estipe macerado com e sem nitrogênio líquido. Fonte: Autores.

A qualidade do DNA genômico obtido foi confirmada pela amplificação das regiões de interesse via reação de PCR (Figuras 5 e 6), apresentando bandas definidas e fragmentos de tamanhos esperados de acordo com os genes amplificados.

O DNA obtido de folha e estipe de *x B. nabonnandii* respondeu bem principalmente à região gênica WRKY-02, onde ocorreram amplificações de DNA nos três espécimes estudados, para todos os métodos avaliados, mostrando um padrão de bandas mais evidente especialmente nos espécimes um e dois (Figura 5). Já para o locus WRKY-12, observou-se amplificações para todos métodos avaliados, com exceção do espécime três (Figura 6c). Ao menos para o estipe, uma hipótese para esse resultado, refere-se à possível relação entre a idade do indivíduo e a queda na qualidade do DNA, pois, dentre as três plantas estudadas, o espécime três está em um estágio de desenvolvimento mais avançado (Figura 1c).

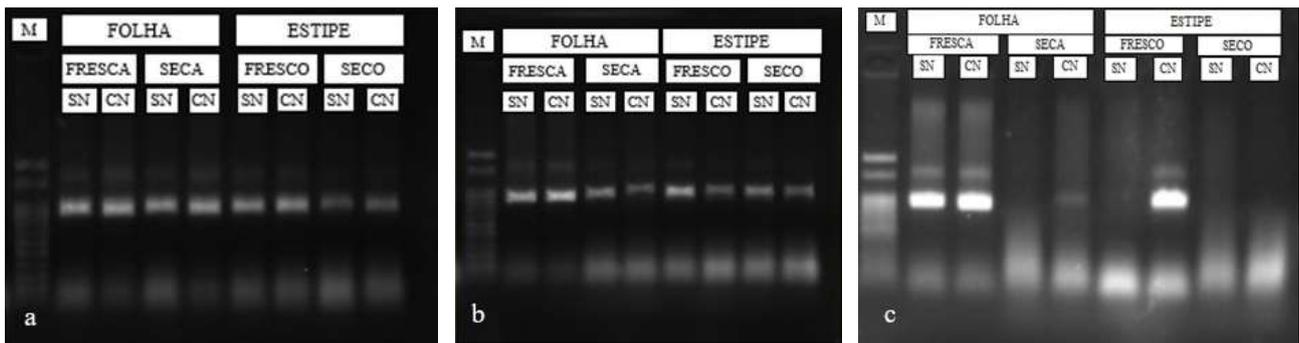
A necessidade do uso de nitrogênio líquido no processo de maceração pode ser questionável, uma vez que a qualidade do DNA obtido a partir da maceração sem esse produto foi perfeitamente adequada para amplificar as regiões de interesse, com padrões de bandas muito semelhantes. A dispensa do uso de nitrogênio líquido foi corroborada por Ihase et al. (2016) e Ibrahim et al. (2010), que investigaram métodos alternativos de maceração em outras espécies de palmeiras, ambos obtendo DNA genômico de boa qualidade para análises moleculares.

Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando os perfis de amplificação do primer WRKY-02 em *Butyragrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster. M = Marcador de tamanho molecular 100 pb. Padrões de bandas observados em a (espécime 1), b (espécime 2), c (espécime 3).



Fonte: Autores.

Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando os perfis de amplificação do primer WRKY-12 em *Butyragrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster. M = Marcador de tamanho molecular 100 pb. Padrões de bandas observados em a (espécime 1), b (espécime 2), c (espécime 3).



Fonte: Autores.

4. Considerações Finais

O DNA isolado de folhas e de tecidos internos do estipe de *x B. nabonnandii* apresentou boa qualidade, uma vez que as duas regiões genômicas de interesse foram amplificadas, mostrando bandas bem definidas e de tamanhos esperados.

Extração de DNA genômico de estipe de *x B. nabonnandii* mostrou-se ser uma boa alternativa, pois o rendimento do material obtido não variou conforme o estado de conservação do material (se fresco ou desidratado), tampouco, com o uso de nitrogênio líquido no processo de maceração. Mesmo com um baixo rendimento em todos os métodos avaliados, o DNA extraído apresentou qualidade satisfatória, amplificando as regiões genômicas de interesse, sobretudo quando extraído de indivíduos mais jovens.

Quanto ao material foliar, a extração de DNA a partir de folhas frescas também se mostrou uma boa alternativa, uma vez que o rendimento de DNA foi maior, amplificou nos três espécimes estudados com bandas bem evidentes e dispensou o uso de nitrogênio líquido no processo de maceração. A extração a partir de folhas desidratadas, entretanto, mesmo apresentando maior rendimento de DNA quando maceradas na presença de nitrogênio líquido, poderia dispensar o uso desse produto, uma vez que não se observou variações evidentes nos padrões das bandas nas reações de PCR.

Para trabalhos futuros, recomenda-se o sequenciamento dos produtos amplificados por PCR e o uso de outros

marcadores moleculares da família gênica WRKY, para a realização de estudos moleculares que colaborem com o conhecimento ainda incipiente desta palmeira híbrida e também de outros representantes da família Arecaceae.

Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório de Diversidade Genética Animal da UNIPAMPA/campus SG pelo empréstimo dos equipamentos necessários para as análises moleculares, aos colegas que eventualmente colaboraram em alguma etapa desse projeto e à bióloga Marícia Fantinel D'Ávila pelas valiosas contribuições ao revisar o manuscrito.

Referências

- Aboul-Maaty, N. A. & Oraby, H. A. (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*, 43 (25), 1-10.
- Arif, I. A.; Bakir, M. A.; Khan, H. A.; Ahamed, A.; Farhan, A. H. A.; Homaidan, A. A. A.; Sadoon, M. A.; Bahkali, A. H. & Shobrak, M. (2010). A simple method for DNA extraction from mature date palm leaves: impact of sand grinding and composition of lysis buffer. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 3149-3157.
- Aydın, Z. U.; Şenova, M. K.; Koch, M. A. & Dönmez, A. A. (2020). DNA from Leaf or Stem: A Comparative Work on *Dianthus L.* for DNA Barcoding Analysis with Four Commercial Extraction Kits. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 48 (4), 333-339.
- Azêvedo, H. S. F. S.; Rufino, P. B.; Azevedo, J. M. A.; Silva, L. M. S.; Wadt, L. H. O. & Campos, T. (2019). Preservação e maceração de tecido de folíolos de açaí da Amazônia para obtenção de DNA genômico. *Bioscience Journal*, 35 (4), 1188-1197.
- Barbosa Rodrigues, J. (1903). Sertum Palmarum Brasiliensium. *Imprimerie Typographique Veuve Monnm*, 2 (1), 116.
- Burret, M. (1940). Um caso de hibridação entre *Arecastrum romanzoffianum* e *Butia capitata*. *Rodriguesia*, 13, 170-173.
- Carvalho, M. S.; Noia, L. R.; Ferreira, M. F. S. & Ferreira, A. (2019). DNA de alta qualidade isolado a partir do córtex de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae). *Ciência Florestal*, 29 (1), 396-402.
- Colpaert, S. C.; Bandou, E.; Caron, H.; Gheysen, G. & Lowe, A. J. (2005). Sampling tissue for DNA analysis of trees trunk cambium as an alternative to canopy leaves. *Silvae Genetica*, 54 (6), 265-269.
- Cruz, C. D. (2016). Genes software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Scientiarum*, 38 (4), 547-552.
- Furtado Filho, J. C.; Silva, J. N.; Viana, J. P. G.; Costa, M. F.; Sousa, C. C.; Gomes, M. F. C.; Lopes, A. C. A. & Valente, S. E. S. (2021). Comparação de métodos de isolamento do DNA em *Handroanthus serratifolius*. *Brazilian Journal of Development*, 7 (4), 35765-35779.
- Hedge, S.; Pai, S. R. & Roy, S. (2017). Combination of DNA isolation and RP-HPLC analysis method for bark samples of *Saraca asoca* and its adulterant. *Biotech*, 7 (208), 208.
- Ihase, L. O.; Horn, R.; Anoliefo, G. O.; Eke, C. R.; Afolab, A. B. & Asemota, O. (2016). Development of a method for DNA extraction from oil palm leaves and the effects of pH and ionic strength on nucleic acid quantification. *Journal of Biological Methods*, 3 (2), e37.
- Laindorf, B. L.; Metz, G. F.; Küster, M. C. T.; Lucini, F.; Freitas, K. E. J.; Victória, F. C. & Pereira, A. B. (2019). Transfer of microsatellite markers from other Arecaceae species to *Syagrus romanzoffiana* (Arecaceae). *Genetics and Molecular Research*, 18 (3), gmr18183.
- Lanes, E. C. M.; Nick, C.; Kuki, K. N.; Freitas, R. D. & Motoike, S. Y. (2013). Genomic DNA isolation of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) from leaf and stipe tissue samples for PCR analysis. *Genetics and Molecular Research*, 12 (3), 3905-3911.
- Lorenzi, H.; Noblick, L. R.; Kahn, F. & Ferreira, E. (2010). *Flora Brasileira: Arecaceae (Palmeiras)*. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 214-255.
- Mangaravite, E.; Terra, V.; Hattori, E. K. O.; Dal'sasso, T. C. S.; Bhering, L. L. & Oliveira, L. O. (2020). A feasible method to extract DNA from the cambium of high-canopy trees: from harvest to assessment. *Acta Amazonica*, 50, 335-338.
- Mauro-Herrera, M.; Meerow A. W.; Borrone, J. W.; Kuhn, D. N. & Schnell, R. J. (2006) Ten informative markers developed from WRKY sequences in coconut (*Cocos nucifera*). *Molecular Ecology Notes*, 6, 904–906.
- Meerow, A. W.; Noblick, L.; Borrone, J. W.; Couvreur, T. L. P.; Mauro-Herrera, M.; Hahn W. J.; Kuhn, D. N.; Nakamura, K.; Oleas, N. H. & Schnell, R. J. (2009). Phylogenetic analysis of seven WRKY Genes across the palm Subtribe Attaleinae (Arecaceae) identifies *Syagrus* as sister group of the coconut. *Plos ONE*, 4 (10), e7353.
- Mello, L. M.; Reiniger, L. R.; Meneghello, G. E.; Villela, F. A. & Mota, M. S. (2015). Isolamento de DNA genômico a partir de folhas e câmbio congelados de *Erythrina crista-galli* L., FABACEAE (Corticeira-do-banhado). *Revista Thema*, 12 (02), 82-93.
- Mo, X. C. & Wangsomnuk, P. P. (2021). A modified non-liquid nitrogen protocol for extraction of high-quality genomic DNA from the inner bark tissues of *Dalbergia cochinchinensis* (Fabaceae). *Genetics and Molecular Research*, 20 (2), gmr18836.

- Novaes, R. M. L.; Rodrigues, J. G. & Lovato, M. B. (2009). An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. *Genetics and Molecular Research*, 8 (1), 86-96.
- Proschowsky, A. R. (1921). Un beau palmier hybride: Butiarecastrum nabonnandi. *Revue Horticole*, 93, 290–291.
- Soares, K. P.; Longhi, S. J.; Witeck Neto, L. & Assis, L. C. (2014). Palmeiras (Arecaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Rodriguésia*, 65 (1), 113-139.
- Tan, H.; Tie, M.; Zhang, L.; Zhu, Y. & Li, H. (2013). The effects of three different grinding methods in DNA extraction of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *African Journal of Biotechnology*, 12 (16), 1946-1951.

5 MANUSCRITO 3

Evidência molecular da hibridização entre *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick e *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman por meio de análises de regiões WRKY

Resumo

A identificação taxonômica da palmeira híbrida \times *Butyagrus nabonnandii* foi feita por meio da morfologia externa e da anatomia foliar, onde ambas se mostraram ferramentas úteis na identificação desse táxon e também na identificação da hibridização entre *Syagrus romanzoffiana* e *Butia odorata*, suas espécies parentais. Entretanto, outras áreas da ciência vêm se mostrando igualmente úteis taxonomicamente, como exemplo, a biologia molecular. Uma ampla gama de marcadores genéticos estão disponíveis para detectar híbridos baseados em variações do DNA. O objetivo do presente estudo é inferir a possibilidade de identificação de híbridos entre *B. odorata* e *S. romanzoffiana* utilizando marcadores moleculares da família gênica WRKY, evidenciando a hibridização entre esses dois táxons. O resultado preliminar revelou que, por meio da análise comparativa das sequências gênicas do locus WRKY-12 dos três táxons envolvidos foi possível identificar o híbrido \times *B. nabonnandii*, evidenciando a hibridização entre *B. odorata* e *S. romanzoffiana*. Pretende-se complementar e fortalecer essa conclusão a partir da ampliação da amostragem e da testagem de outros marcadores WRKY.

Palavras-chave: Areaceae; biologia molecular; palmeira híbrida; taxonomia.

1 Introdução

A palmeira \times *Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster é um híbrido natural fruto do cruzamento intergenérico entre *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick e *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman, ocorrendo no sul do Brasil e sudeste do Uruguai (Noblick, 2010; Soares *et al.* 2014; Rivas *et al.*, 2017; Oliveira-Neves *et al.*, 2022; Rosa *et al.*, 2023). O cruzamento natural entre essas duas espécies foi oficialmente relatado pela primeira vez na obra de Barbosa Rodrigues (1903), para espécimes no Uruguai, e por Burret (1940), para espécimes no Brasil.

A identificação da suposta hibridização se deu, inicialmente, por meio de análises da morfologia externa do híbrido, cujos dados descritivos foram publicados nos trabalhos de Noblick (2010), Soares *et al.* (2014) e Rosa *et al.* (2023). Mais recentemente, dados da anatomia foliar foram igualmente úteis na identificação de \times *B. nabonnandii* e diferenciação entre seus parentais, comprovando a sua origem híbrida (Oliveira-Neves *et al.*, 2023, trabalho submetido à revista *Rodriguésia* ID ROD-2023-0105).

O conhecimento da morfologia vegetal sempre foi fundamental para o sucesso da identificação

científica, porém, a taxonomia vem progredindo com o uso continuado e cuidadoso de ferramentas, como ecologia, citologia, genética, bioquímica, biologia molecular, anatomia, etc (Martins-da-Silva *et al.*, 2014).

Em Arecaceae, por exemplo, a anatomia foliar já vem há muito tempo mostrando um papel relevante na identificação e circunscrição em alguns grupos (Tomlinson, 1961; Silva & Potiguara, 2008; Noraini *et al.*, 2012; Kikuchi *et al.*, 2016; Silva & Lemos, 2020), pois nem sempre a morfologia consegue resolver aspectos taxonômicos em alguns gêneros. Especialmente em relação aos gêneros *Butia* e *Syagrus*, a anatomia foliar vem se mostrando cada vez mais uma ferramenta bastante útil, tão importante como a morfologia (Noblick, 2013; 2017; Noblick *et al.*, 2014; Firmo *et al.*, 2021; Noblick & Sant'Anna-Santos, 2021; Sant'Anna-Santos, 2021; Martins *et al.*, 2015; Defaveri *et al.*, 2015; Pinedo *et al.*, 2016; Sant'Anna-Santos *et al.*, 2015, 2018, 2023a, 2023b, 2023c; Vianna *et al.*, 2017; Vianna, 2017).

No que tange à biologia molecular, uma ampla gama de marcadores genéticos estão disponíveis para detectar híbridos baseados em variações do DNA (Gros-Balthazard, 2013). A utilização de marcadores RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) e de isoenzimas são alguns exemplos usados na palmeira do gênero *Phoenix* para diferenciar populações e também supostos espécimes híbridos fruto de cruzamentos interespecíficos (González-Pérez *et al.*, 2004; González-Pérez & Sosa, 2009; Flowers *et al.*, 2019). Outro tipo de marcador que vem sendo utilizado na identificação de híbridos são os marcadores microssatélites (SSR), que são altamente variáveis, e por isso, capazes de tal inferência (Gros-Balthazard, 2013). Os SSR já têm sido amplamente usados na identificação de híbridos de espécies de cultivo, como o arroz (Gealy *et al.*, 2002; Goulart *et al.*, 2011), espécies de *Citrus* (Cristofani *et al.*, 2001) e milho (Grassi *et al.*, 2015).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo é inferir a possibilidade de identificação de híbridos entre *B. odorata* e *S. romanzoffiana* utilizando marcadores moleculares da família gênica WRKY, evidenciando a hibridização entre esses dois táxons.

2 Material e Métodos

2.1 Material vegetal em estudo

Amostras de folhas de espécimes adultos foram coletadas de $\times B. nabonnandii$, *B. odorata* e *S. romanzoffiana*. Para $\times B. nabonnandii$, foram coletados também amostras de tecidos internos do estipe, cuja metodologia de coleta consta em Oliveira-Neves *et al.* (2022).

2.2 Extração, quantificação e amplificação do DNA genômico

A descrição das metodologias utilizadas nos processos de extração, quantificação e amplificação do DNA genômico extraído de materiais biológicos de *B. nabonnandii* e das espécies parentais constam no trabalho de Oliveira-Neves *et al.* (2022). Os primers utilizados correspondem a sequências gênicas da família WRKY desenvolvidos para *Cocos nucifera* L. (Mauro-Herrera *et al.*, 2006) e adaptadas por Meerow *et al.* (2009), totalizando o uso de seis marcadores dessa família gênica (Tabela 1).

As análises moleculares estão sendo realizadas no Laboratório de Análises de Ácidos Nucleicos do Centro de Pesquisas Biotecnológicas (CIPBiotec) da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), campus São Gabriel/RS.

2.3 Purificação e sequenciamento do DNA genômico

A purificação das amostras é feita a partir do kit comercial QIAquick PCR Purification[®] (Hilden, Germany). O sequenciamento de DNA é realizado pela empresa Ludwig Biotecnologia Ltda, usando primers específicos para as sequências de interesse (forward e reverse). Os resultados dos sequenciamentos estão sendo analisados no software Bioedit.

2.4 Uso de marcadores SNP (Polimorfismo de Nucleotídeo Único) para identificação da hibridização

Variações por substituição em um único par de nucleotídeos de um determinado gene são chamadas de Polimorfismo de Nucleotídeo Único, do inglês Single Nucleotide Polimorfism (SNP) (Filho *et al.*, 2021).

Segundo Caetano (2009), os marcadores SNP tem como base as alterações mais elementares da molécula de DNA, ou seja, mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas (Adenina, Citosina, Timina e Guanina), que podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória, porém, na maior parte das vezes são encontrados em espaços intergênicos, sem função determinada.

Foi consultada a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) para a interpretação dos códigos observados nos sítios polimórficos da sequência do híbrido.

Tabela 1. Sequências de primers utilizadas para amplificar o DNA genômico de *×Butyagrus nabonnandii*, *Butia odorata* e *Syagrus romanzoffiana*, correspondentes aos loci WRKY-02, WRKY-12, WRKY-06, WRKY-07, WRKY-12, WRKY-21.

Locus	Forward	Reverse
WRKY2	ACAATCACCCCAGGCTTTCTCA	ATTCCACAACCCCGATGCTTC
WRKY6	CCAAACCCAAGGTAGGTTTCAGC	CCTAACAGGGCACCCAGCATT
WRKY7	ACCCAAAGCCTCCACACA	TCACCGCCCTTGGATCAT
WRKY12	GGGTGCTCACAACCACTCCA	TGCCCTCTCCACATGCTTTC
WRKY16	AGCCGTCAAAAACAGCCCAT	CAAAGCAGCCACCGAGTTACA
WRKY21	AGAGTAACCCATGCCACGA	GCACACCTCTGCACCTGAAA

Fonte: Meerow *et al.* (2009).

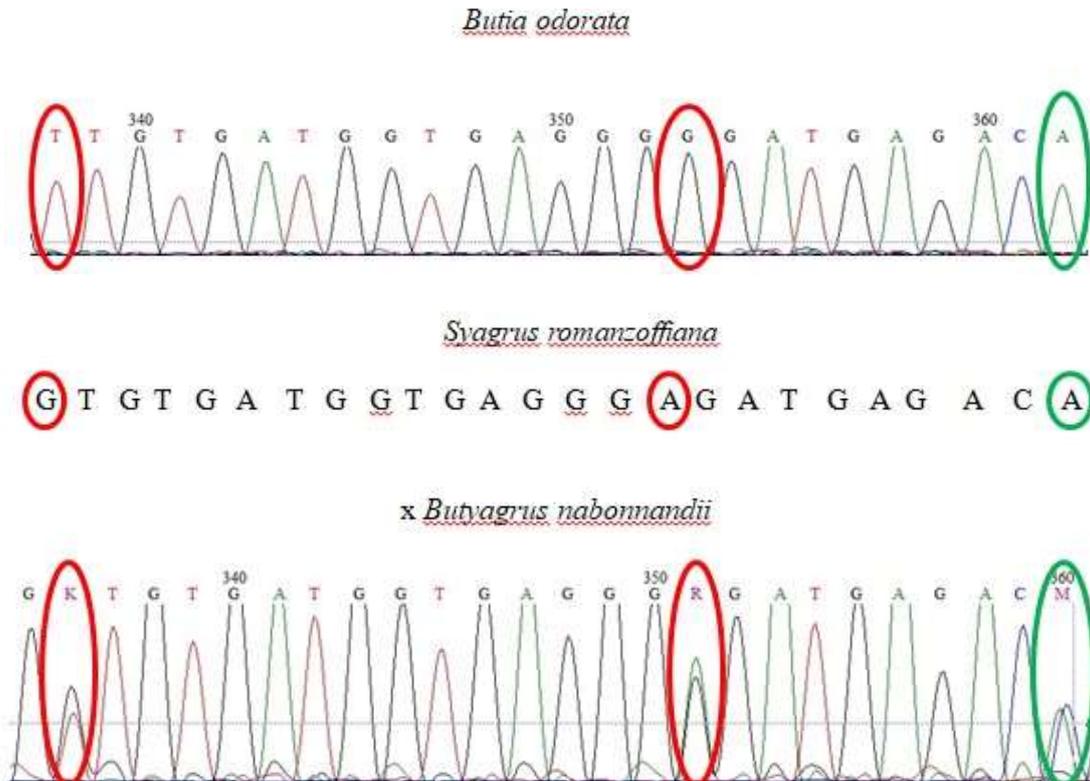
3 Resultado parcial

O resultado parcial apresentado refere-se à análise da sequência do locus WRKY-12. Para a análise comparativa, produtos de PCR das três espécies foram sequenciados, porém, obteve-se sequências de qualidade apenas para *×B. nabonnandii* e *B. odorata*. Para fins de comparação, a sequência utilizada para *S. romanzoffiana* foi a depositada no GenBank (FJ957275.1), o principal banco de dados de sequências de ácidos nucléicos (Sayers *et al.*, 2018).

A identificação da hibridização entre *B. odorata* e *S. romanzoffiana* é feita a partir de polimorfismos observados em sítios correspondentes na sequência do suposto híbrido, chamados de SNPs (Polimorfismos de nucleotídeo único), que é uma variação genética onde há substituição de uma base em uma posição específica. Para a interpretação dos códigos observados nos sítios polimórficos, foi consultada a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC).

Nessa primeira análise, foi usada a sequência de um espécime do híbrido, onde foram observados oito SNPs, que correspondem a sítios heterozigotos que comprovam a hibridização entre as espécies parentais em questão. No fragmento constante na Figura 1, são observados três SNPs, sendo que apenas dois correspondem à heterozigose fruto de hibridização (letras K e R). O outro polimorfismo observado corresponde a uma variação genética do próprio indivíduo (letra M). Os demais SNPs de hibridização observados nessa sequência gênica constam no Anexo II.

Figura 1. Esferogramas referentes ao fragmento da sequência gênica do locus WRKY 12, destacando os SNPs encontrados em \times *Butyagrus nabonmandii*. Segundo IUPAC, letra K (nucleotídeo G ou T); letra M (nucleotídeo A ou C). Círculos vermelhos indicam heterozigose de hibridização; círculo verde indicam variação genética.



Fonte: Autores (esferogramas *B. odorata* e \times *B. nabonmandii*); GenBank (sequência *S. romanzoffiana*).

4 Conclusão preliminar

A partir da análise comparativa das sequências gênicas do locus WRKY-12 dos três táxons envolvidos foi possível inferir a hibridização entre *B. odorata* e *S. romanzoffiana*, identificando, por conseguinte, o híbrido fruto desse cruzamento.

Este estudo encontra-se em andamento, então, pretende-se complementar e fortalecer essa conclusão a partir da ampliação da amostragem e da testagem de outros marcadores WRKY.

5 Referências Bibliográficas

APG IV. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society** 181: 1–20.

Barbosa Rodrigues, J. 1903. Sertum Palmarum Brasiliensium. **Imprimerie Typographique Veuve Monnm** 2: 116.

Burret, M. 1940. Um caso de hibridação entre *Arecastrum romanzoffianum* e *Butia capitata*. **Rodriguesia** 4: 170-173.

- Cristofani, M.; Novelli, V. M.; Oliveira, A. C.; Otaviano, A. R.; Souza, A. A. & Machado, M. A. 2001. Identificação de híbridos de cruzamentos interespecíficos em citros utilizando marcadores RAPD e SSR. **Laranja** **22**: 231-241.
- Defaveri, A. C. A.; Barros, C. F.; Arruda, R. C. O.; Simas, N. K. & Sato, A. 2015. *Allagoptera arenaria* (Arecaceae): leaf anatomy of a palm from the Brazilian shore. **Brittonia** **67**: 336–349.
- Firmo, D. H. T.; Santos, S. A.; Perez, M. E. M. P.; Soffiatti, P. & Sant’Anna-Santos, B. F. 2021. Reassessing species boundaries in the *Syagrus glaucescens* complex (Arecaceae) using leaf anatomy. **Botany** **99**: 379-387.
- Flowers, J. M.; Hazzouri, K. M.; Gros-Balthazard, K.; Mo, Z.; Koutroumpa, K.; Perrakis, A.; Ferrand, S.; Khierallah, S. M.; Fuller, D. Q.; Aberlenc, F.; Fournaraki, C. & Purugganan, M. D. 2019. Cross-species hybridization and the origin of North African date palms. **PNAS** **116**: 1651-1658.
- Gealy, D. R.; Tai, T. H. & Sneller, C. H. 2002. Identification of red rice, rice, and hybrid populations using microsatellite markers. **Weed Science** **50**: 333-339.
- GenBank. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Acesso em 5 de julho de 2022.
- Glassman, S. F. 1970. A new hybrid in the palm genus *Syagrus* Mart. **Fieldiana** **32**: 241-257.
- González-Pérez, M. A.; Caujapé-Castells, J. & Sosa, P. A. 2004. Molecular evidence of hybridisation between the endemic *Phoenix canariensis* and the widespread *P. dactylifera* with Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. **Plant Systematics and Evolution** **247**: 165-175.
- Goulart, I. C. G. R.; Merotto Junior, A.; Nunes, A. L. & Bered, F. 2011. Otimização da utilização de marcadores moleculares microssatélites e sua aplicação em estudos com plantas daninhas. **Planta Daninha** **29**: 1175-1181.
- Grassi, P. G. M.; Andrade, J. A. C.; Silva, C. L. S. P.; Moraes, M. L. T. & Ceresini, P. C. 2015. Divergência genética entre linhagens de milho utilizando microssatélites e correlações com o desempenho de híbridos simples. **Cultura Agrônômica** **24**: 1-16.
- Kikuchi, T. Y. S.; Braga, Z. V. & Potiguara, R. C. V. 2016. Anatomia foliar de *Socratea exorrhiza* (Mart.) H. Wendl. (Arecaceae). **Biota Amazonica** **6**: 73-79.
- Martins-da-Silva, R. C. V.; Silva, A. S. L.; Fernandes, M. M. & Margalho, L. F. 2014. **Noções morfológicas e taxonômicas para identificação botânica**. Brasil, DF: Embrapa. 111 p.
- Martins, R. C.; Filgueiras, T. S.; Graciano-Ribeiro, D. & Somavilla, N. S. 2015. A new species of *Allagoptera* (Arecaceae) from the Cerrado of central Brazil. **Phytotaxa** **197**: 115-124.
- Mauro-Herrera, M.; Meerow A. W.; Borrone, J. W.; Kuhn, D. N. & Schnell, R. J. 2006. Ten informative markers developed from WRKY sequences in coconut (*Cocos nucifera*). **Molecular Ecology Notes** **6**: 904–906.
- Meerow, A. W.; Noblick, L.; Borrone, J. W.; Couvreur, T. L. P.; Mauro-Herrera, M.; Hahn W. J.; Kuhn, D. N.; Nakamura, K.; Oleas, N. H. & Schnell, R. J. 2009. Phylogenetic analysis of seven WRKY Genes across the palm Subtribe Attaleinae (Arecaceae) identifies *Syagrus* as sister group of the coconut. **Plos**

ONE 4: e7353.

Noblick, L. R. 2010. *Butia*. In: Lorenzi H, Noblick LR, Kahn F, Ferreira E (Eds) Flora brasileira: Arecaceae (palmeiras). Instituto Plantarum, Nova Odessa. 159-184p.

Noblick, L. R. 2013. Leaflet anatomy verifies relationships within *Syagrus* (Arecaceae) and aids in identification. **PhytoKeys 26:** 75–99.

Noblick, L. R. 2014. *Butia*: what we think we know about the genus. **The Palm Journal 208:**1–23.

Noblick, L. R. 2017. Key to *Syagrus* identification using leaflet margin anatomy: supplement to “A revision of *Syagrus* (Arecaceae)”. **Phytokeys 81:** 19-43.

Noblick, L. R.; Lorenzi, H. & Souza, V. C. 2014. Four new taxa of acaulescent *Syagrus* (Arecaceae) from Brazil. **Phytotaxa 188:** 001-013.

Noblick, L. R. & Sant’Anna-Santos, B. F. 2021. Diversity of leaf anatomy within a single leaflet and between leaflets of four *Butia* (Arecaceae, Arecoideae) species. **Phytokeys 180:** 31-52.

Noraini, T.; Ruzi, A. R.; Nurnida, M. K. & Hajar, N. R. 2012. Systematic significance of leaf anatomy in *Johannesteijsmannia* H. E. Moore (Arecaceae). **Pertanika Journal Tropical Agricultural Science 35:** 223-235.

Oliveira-Neves, P.; Pereira, A. B.; Cañedo, A. D.; Souza, V. Q.; Laindorf, B. L.; Azambuja, M. B. & Rosa, L. Z. 2022. Análise quali-quantitativa do DNA genômico extraído de folha e estipe de *×Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster. **Research, Society and Development 11:** e572111033005

Oliveira-Neves, P.; Sant’Anna-Santos, B. F.; Pereira, A. B. & Rosa, L. Z. 2023. **Leaf anatomy of *×Butyagrus nabonnandii* (Arecaceae) as a tool for its identification.** Rodriguésia, Submitted (ROD-2023-0105).

Pinedo, A. S.; Martins, R. C.; de Oliveira, R. C. & Gomes, S. M. 2016. Leaflet anatomy in *Allagoptera* (Arecaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society 182:** 361–375.

Rivas, M.; Filippini, J. M.; Cunha, H.; Hernández, J.; Resnichenko, Y. & Barbieri, R. L. 2017. Palm Forest landscape in Castillos (Rocha, Uruguay): contributions to the design of a conservation area. **Open Journal of Forestry 7:** 97-120.

Rosa, L. Z.; Sant’Anna-Santos, B. F.; Almeida, C. G.; Kuhn, S. A.; Hüther, C. M. & Souza, V. Q. 2023. *× Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster (Arecaceae): a sterile and rare palm with variable morphology? **Brazilian Journal of Biology 83:** e271366.

Sant’Anna-Santos, B. F. 2021. A new endemic and critically endangered species of *Butia* (Arecaceae) with comments on morpho-anatomical novelties in the genus. **Plant Systematics and Evolution 307:** 1-16.

Sant’Anna-Santos, B. F.; Carvalho Júnior, W. G.; Amaral, V. B. 2015. *Butia capitata* (Mart.) Becc. lamina anatomy as a tool for taxonomic distinction from *B. Odorata* (Barb. Rodr.) Noblick comb. nov (Arecaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências 87:** 71–81.

- Sant'Anna-Santos, B. F.; Santos, S. A.; Nunes, E. L.; Francino, D. M. T. & Carvalho Júnior, W. G. O. 2018. Does leaf anatomy aid in species identification of *Butia* (Arecaceae)? **AoB PLANTS**: 1-15.
- Sant'Anna-Santos, B. F.; Azevedo, I. F. P.; Micheli, R. & Soffiatti, P. 2023a. Morpho-anatomical novelties of a dwarf *Syagrus* (Arecaceae) of canga: implications for ecology, conservation, and taxonomy. **Plant Systematics and Evolution** **309**: 8.
- Sant'Anna-Santos, B. F.; Micheli, R.; Carvalho, L. F. L. & Soffiatti, P. 2023b. A new bluish-leaved *Syagrus* (Arecaceae) from an overlooked OCBIL in the Espinhaço Range (Brazil). **Plant Ecology and Evolution** **156**: 129-145.
- Sant'Anna-Santos BF, Carvalho LFL & Soffiatti P. 2023c. A new rupicolous palm from the campos rupestres, Minas Gerais, Brazil. **Edinburgh Journal of Botany** **80**: 1-15.
- Silva, R. J. F. & Potiguara, R. C. V. 2008. Aplicações taxonômicas da anatomia foliar de espécies amazônicas de *Oenocarpus* Mart. (Arecaceae). **Acta Botanica Brasilica** **22**: 999-1014.
- Sayers, E. W.; Cavanaugh, M.; Clark, K.; Ostell, J.; Pruitt, K. D. & Karsch-Mizrachi, I. 2018. GenBank. **Nucleic Acids Research** **47**: 94–99.
- Silva, I. I. C. & Lemos, J. R. 2020. Estudo anatômico de *Copernicia prunifera* (Mill.) H. E. Moore (Arecaceae) presente em mancha de caatinga no extremo norte do Piauí. **Pesquisas no Seminário Piauiense** **6**: 35-45.
- Soares, K. P.; Longhi, S. J.; Witeck Neto, L. & Assis, L. C. 2014. Palms (Arecaceae) from Rio Grande do Sul, Brazil. **Rodriguesia** **65**: 113-139.
- Tomlinson, P. B. 1961. **Anatomy of the monocotyledons: II palmae**. Clarendon Press, Oxford
- Vianna, S. A. 2017. A new species of *Acrocomia* (Arecaceae) from Central Brazil. **Phytotaxa** **314**: 45-54.
- Vianna, S. A.; Carmelo-Guerreiro, S. M.; Noblick, L. & Colombo, C. A. 2017. Leaf anatomy of *Acrocomia* (Arecaceae): an additional contribution to the taxonomic resolution of a genus with great economic potential. **Oesterreichische Botanische Zeitschrift** **303**: 1-16.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise da anatomia foliar de \times *Butyagrus nabonnandii* mostrou que o híbrido apresenta um padrão anatômico peculiar, apresentando caracteres anatômicos intermediários de *Syagrus romanzoffiana* e de *Butia odorata*, permitindo sua diferenciação dos táxons parentais e comprovando a sua origem híbrida. O uso da anatomia foliar para a identificação e diferenciação do híbrido mostra-se relevante, sobretudo, em casos de dúvidas taxonômicas de materiais depositados em herbário, onde se tem apenas uma pequena amostra do espécime. O resultado aqui apresentado enfatiza a relevância da anatomia foliar na circunscrição e identificação de espécies em Arecaceae.

Em relação à abordagem molecular, os resultados aqui apresentados mostraram que, independente do material biológico coletado e da forma de preservação, foi possível obter DNA de \times *B. nabonnandii* de qualidade suficiente para amplificar as regiões genômicas de interesse. Ainda, mostrou-se que o uso de nitrogênio líquido no processo de extração pode ser dispensado, o que facilita muito essa etapa.

Ainda, a partir da análise comparativa dos sequenciamentos de uma das regiões gênicas WRKY, foi possível inferir a hibridização entre *Butia odorata* e *Syagrus romanzoffiana*, e assim, identificar o híbrido fruto desse cruzamento. A ampliação da amostragem e a testagem de outros marcadores gênicos WRKY estão em curso para complementar e fortalecer essa conclusão preliminar.

Em síntese, os resultados aqui apresentados demonstraram que a anatomia vegetal e a biologia molecular são ferramentas tão valiosas quanto a morfologia vegetal para a identificação de \times *B. nabonnandii* e evidenciação da sua origem híbrida.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asmussen, C. B.; Dransfield, J.; Deickmann, V.; Barfod, A. S.; Pintaud, J. C. & Baker, W. J. 2006. A new subfamily classification of the palm family (Arecaceae): evidence from plastid DNA phylogeny. **Botanical Journal of the Linnean Society** **151**:15-38.
- Azambuja, M. B. & Pereira, A. B. 2022. Revisão histórica da taxonomia do gênero *Butia* (Becc.) Becc. (Arecaceae) e seus híbridos naturais. **Research, Society and Development** **11**: e23111335003.
- Baker, W. J. & Dransfield, J. 2016. Beyond Genera Palmarum: progress and prospects in palm systematics. **Botanical Journal of the Linnean Society** **182**: 207–233.
- Barbosa Rodrigues, J. 1903. Sertum Palmarum Brasiliensium. **Imprimerie Typographique Veuve Monnm** **2**: 116.
- Borrone, J. W.; Kuhn, D. N.; Schnell, R. J. 2004. Isolation, characterization, and development of WRKY genes as useful genetic markers in *Theobroma cacao*. **Theoretical and Applied Genetics** **109**: 495–507.
- Burret, M. 1940. Um caso de hibridação entre *Arecastrum romanzoffianum* e *Butia capitata*. **Rodriguesia** **4**: 170-173.
- Caetano, A. R. 2009. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia** **38**: 64-71.
- Chase, M. W. et al. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society** **181**: 1-20.
- Defaveri, A. C. A.; Barros, C. F.; Arruda, R. C. O.; Simas, N. K. & Sato, A. 2015. *Allagoptera arenaria* (Arecaceae): leaf anatomy of a palm from the Brazilian shore. **Brittonia** **67**: 336–349.
- Engels, M. E.; Meyer, T. A. & Soares, K. P. 2021. Um novo × *Butyagrus* (Arecaceae) do Planalto Sul Brasileiro. **Hoehnea** **48**: e412020.
- Eslabão, M. P.; Ellert-Pereira, P. E.; Barbieri, R. L. & Heiden, G. 2015. Distribuição geográfica de *Butia* (Arecaceae) nos biomas Mata Atlântica e Pampa no Rio Grande do Sul. **In: Semana Integrada 2015 UFPEL - XVII ENPOS, Pelotas.**
- Eslabão, M. P.; Ellert-Pereira, P. E.; Barbieri, R. L. & Heiden, G. 2016. Mapeamento da distribuição de *Butia* (ARECACEAE). **In: XVIII Encontro de Pós-graduação Universidade Federal de Pelotas (ENPOS).**
- Eulgem, T.; Rushton, P. J.; Robatzek, S. & Somssich, I. E. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. **Trends Plant Sci** **5**: 199–206.
- Firmo, D. H. T.; Santos, S. A.; Perez, M. E. M. P.; Soffiatti, P. & Sant’Anna-Santos, B. F. 2021. Reassessing species boundaries in the *Syagrus glaucescens* complex (Arecaceae) using leaf anatomy. **Botany** **99**: 379-387.
- Filho, B. P.; Massabani, E. M.; Diegues, M. E. M.; Abrão, R. M.; Corrêa, N. A. B. & Gasques, L. S.

2021. A ação dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) sobre o gene FTO, sua relevância e influência na obesidade: levantamento cienciométrico. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR** **25**: 61-77.

Flowers, J. M.; Hazzouri, K. M.; Gros-Balthazard, K.; Mo, Z.; Koutroumpa, K.; Perrakis, A.; Ferrand, S.; Khierallah, S. M.; Fuller, D. Q.; Aberlenc, F.; Fournaraki, C. & Purugganan, M. D. 2019. Cross-species hybridization and the origin of North African date palms. **PNAS** **116**: 1651-1658.

FZB/RS (FUNDAÇÃO ZOOBOTÂNICA DO RIO GRANDE DO SUL). 2014. Decreto 52.109 de 19 de dezembro de 2014. **Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no Estado do Rio Grande do Sul**. Acessado em 28 junho 2023.

Glassman, S. F. 1970. A new hybrid in the palm genus *Syagrus* Mart. **Fieldiana** **32**: 241-257.

Glassman, S. F. 1979. Re-evaluation of the genus *Butia* with a description of a new species. **Principes** **23**: 65-79.

González-Pérez, M. A.; Caujapé-Castells, J. & Sosa, P. A. 2004. Molecular evidence of hybridisation between the endemic *Phoenix canariensis* and the widespread *P. dactylifera* with Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. **Plant Systematics and Evolution** **247**: 165-175.

Gros-Balthazar, M. 2013. Hybridization in the genus *Phoenix*: a review. **Emirates Journal of Food and Agriculture** **25**: 831-842.

Guevara, L. I.; Stauffer, F. W.; Jáuregui, D. J. 2011. Anatomía comparativa de las lámina foliar y sistemática en las subtribu neotropical Mauritiinae (Arecaceae, Calamoideae). **Brittonia** **63**: 379-395.

IUCN. 2012. **IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1**. 2nd ed. Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN. 32 p.

Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellog, E. A.; Stevens, P. F. & Donoghue, M. J. 2009. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. Editora Artmed: São Paulo. 632p.

Kikuchi, T. Y. S.; Braga, Z. V. & Potiguara, R. C. V. 2016. Anatomia foliar de *Socratea exorrhiza* (Mart.) H. Wendl. (Arecaceae). **Biota Amazonica** **6**: 73-79.

Lima, G. P. & Almeida Jr., E. B. 2020. Synopsis of the tribe Cocoseae Mart. (Arecaceae, Arecaceae) in the state of Maranhão, Brazil. **Biota Neotropica** **20**: e20190922.

Lorenzi, H. 2010. *Attalea*. In: Lorenzi H, Noblick LR, Kahn F, Ferreira E (Eds) Flora brasileira: Arecaceae (palmeiras). Instituto Plantarum, Nova Odessa. 66-103p.

Marchi, M. M.; Barbieri, R. L. & Sosinski Jr., E. E. 2018. Recursos Genéticos e a conservação in situ de ecossistemas de butiazais no Sul do Brasil. **Revista RG News** **5**: 1-4.

Martins, R. C.; Filgueiras, T. S.; Graciano-Ribeiro, D. & Somavilla, N. S. 2015. A new species of *Allagoptera* (Arecaceae) from the Cerrado of central Brazil. **Phytotaxa** **197**: 115-124.

Mauro-Herrera, M.; Meerow A. W.; Borrone, J. W.; Kuhn, D. N. & Schnell, R. J. 2006. Ten informative markers developed from WRKY sequences in coconut (*Cocos nucifera*). **Molecular Ecology Notes** **6**:

904–906.

Mauro-Herrera, M.; Meerow A. W.; Borrone, J. W.; Kuhn, D. N. & Schnell, R. J. 2007. Usefulness of WRKY gene-derived markers for assessing genetic population structure: na example with Florida coconut cultivars. **Scientia Horticulturae 115**: 19-26.

Meerow, A. W.; Noblick, L.; Borrone, J. W.; Couvreur, T. L., Mauro-Herrera, M.; Hahn, W. J. & Schnell, R. J. 2009. Phylogenetic analysis of seven WRKY genes across the palm subtribe Attaleinae (Arecaceae) identifies *Syagrus* as sister group of the coconut. **PLoS ONE 4**: e7353.

Meerow, A. W.; Noblick, L.; Salas-Leiva, D. E.; Sanchez, V.; Francisco-Ortega, J.; Jestrow, B. & Nakamura, K. 2015. Phylogeny and historical biogeography of the cocosoid palms (Arecaceae, Arecoideae, Cocoseae) inferred from sequences of six WRKY gene family loci. **Cladistics 31**: 509-534.

Moore, H.E., Jr. 1982. Nomenclatural notes. **Principes 26**: 50.

Noblick, L. R. 2004. Transfer of *Syagrus campicola* to *Butia*. **Palms 48**: 42.

Noblick, L. R. 2006. The grassy *Butia* (Arecaceae): two new species and a new combination. **Palms 50**: 167–178

Noblick, L.R. 2010a. *Butia*. **In**: Lorenzi H, Noblick LR, Kahn F, Ferreira E (Eds) Flora brasileira: Arecaceae (palmeiras). Instituto Plantarum, Nova Odessa. 159-184p.

Noblick, L.R. 2010b. *Syagrus*. **In**: Lorenzi H, Noblick LR, Kahn F, Ferreira E (Eds) Flora brasileira: Arecaceae (palmeiras). Instituto Plantarum, Nova Odessa. 304-360p.

Noblick, L. R. 2012. *Syagrus* × *mirandana*, a naturally occurring hybrid of *Syagrus coronata*. **Palms 56**: 57–60.

Noblick, L. R. 2013. Leaflet anatomy verifies relationships within *Syagrus* (Arecaceae) and aids in identification. **PhytoKeys 26**: 75–99.

Noblick, L. R. 2017a. A revision of the genus *Syagrus* (Arecaceae). **Phytotaxa 294**: 1–262.

Noblick, L. R. 2017b. Key to *Syagrus* identification using leaflet margin anatomy: supplement to “A revision of *Syagrus* (Arecaceae)”. **Phytokeys 81**: 19-43.

Noblick, L. R. 2018. *Syagrus guaratingensis*: a new species from Bahia, Brazil. **Palms 62**: 77-86.

Noblick, L. R.; Lorenzi, H. & Souza, V. C. 2014. Four new taxa of acaulescent *Syagrus* (Arecaceae) from Brazil. **Phytotaxa 188**: 1–13.

Noblick, L. R. & Sant’Anna-Santos, B. F. 2021. Diversity of leaf anatomy within a single leaflet and between leaflets of four *Butia* (Arecaceae, Arecoideae) species. **Phytokeys 180**: 31-52.

Noraini, T.; Ruzi, A. R.; Nurnida, M. K. & Hajar, N. R. 2012. Systematic significance of leaf anatomy in *Johannesteijsmannia* H. E. Moore (Arecaceae). **Pertanika Journal Tropical Agricultural Science 35**: 223-235

- Oliveira-Neves, P.; Pereira, A. B.; Cañedo, A. D.; Souza, V. Q.; Laindorf, B. L.; Azambuja, M. B. & Rosa, L. Z. 2022. Análise quali-quantitativa do DNA genômico extraído de folha e estipe de *×Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster. **Research, Society and Development** **11**: e572111033005.
- Pinedo, A. S.; Martins, R. C.; de Oliveira, R. C.; Gomes, S. M. 2016. Leaflet anatomy in *Allagoptera* (Arecaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **182**: 361–375
- Pintaud, J. C.; Zehdi, S.; Couvreur, T.; Barrow, S.; Henderson, S.; Aberlenc-Bertossi, F.; Tregear, J. & Billotte, N. 2010. Species delimitation in the genus *Phoenix* (Arecaceae) based on SSR markers, with emphasis on the identity of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.). In Seberg O, Petersen G, Barfod A, Davis J. (Eds.): Diversity, phylogeny and evolution in the Monocotyledons. Aarhus University Press, Denmark. 267-286 p.
- Portelinha, M. K.; Barbieri, R. L.; Godinho, P. S. & Almeida, C. 2020. Os butiazeiros e a Rota dos Butiazais, sementes de cuidado e conexão. Vittalle – **Revista de Ciências da Saúde** **32**: 135-145.
- Proschowsky, A. R. 1921. Um beau palmier hybride: *Butyarecastrum nabonnandi*. **Revue Horticole** **93**: 290-291.
- Rivas, M.; Filippini, J. M.; Cunha, H.; Hernández, J.; Resnichenko, Y. & Barbieri, R. L. 2017. Palm Forest landscape in Castillos (Rocha, Uruguay): contributions to the design of a conservation area. **Open Journal of Forestry** **7**: 97-120.
- Rosa, L. Z.; Sant’Anna-Santos, B. F.; Almeida, C. G.; Kuhn, S. A.; Hüther, C. M. & Souza, V. Q. 2023. *×Butyagrus nabonnandii* (Prosch.) Vorster (Arecaceae): a sterile and rare palm with variable morphology? **Brazilian Journal of Biology** **83**: e271366.
- Sanín, M. J. & Galeano, G. 2011. A revision of the Andean wax palms, *Ceroxylon* (Arecaceae). **Phytotaxa** **34**: 1–64.
- Sant’Anna-Santos, B. F. 2021. A new endemic and critically endangered species of *Butia* (Arecaceae) with comments on morpho-anatomical novelties in the genus. **Plant Systematics and Evolution** **307**: 1-16.
- Sant’Anna-Santos, B. F.; Carvalho Júnior, W. G. & Amaral, V. B. 2015. *Butia capitata* (Mart.) Becc. lamina anatomy as a tool for taxonomic distinction from *B. Odorata* (Barb. Rodr.) Noblick comb. nov (Arecaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências** **87**: 71–81.
- Sant’Anna-Santos, B. F.; Santos, A. S.; Nunes, E. L. P.; Francino, D. M. T. & Carvalho Júnior, W. G. O. 2018. Does leaf anatomy aid in species identification of *Butia* (Arecaceae)? **AoB PLANTS**: 1-15.
- Sant’Anna-Santos, B. F.; Azevedo, I. F. P.; Micheli, R.; Soffiatti, P. 2023a. Morpho-anatomical novelties of a dwarf *Syagrus* (Arecaceae) of canga: implications for ecology, conservation, and taxonomy. **Plant Systematics and Evolution** **309**: 8.
- Sant’Anna-Santos, B. F.; Micheli, R.; Carvalho, L. F. L. & Soffiatti, P. 2023b. A new bluish-leaved *Syagrus* (Arecaceae) from an overlooked OCBIL in the Espinhaço Range (Brazil). **Plant Ecology and Evolution** **156**: 129-145.

- Sant'Anna-Santos BF, Carvalho LFL & Soffiatti P. 2023c. A new rupicolous palm from the campos rupestres, Minas Gerais, Brazil. *Edinburgh Journal of Botany* 80: 1-15.
- Silva, R. J. F. & Potiguara, R. C. V. 2008. Aplicações taxonômicas da anatomia foliar de espécies amazônicas de *Oenocarpus* Mart. (Arecaceae). *Acta Botanica Brasílica* 22: 999-1014.
- Silva, I. I. C. & Lemos, J. R. 2020. Estudo anatômico de *Copernicia prunifera* (Mill.) H. E. Moore (Arecaceae) presente em mancha de caatinga no extremo norte do Piauí. *Pesquisas no Seminário Piauiense* 6: 35-45.
- Soares, K.P. 2020. *Syagrus*. In: Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB15745>. Acessado em 03 abril 2023.
- Soares, K. P.; Longhi, S. J.; Witeck Neto, L. & Assis, L. C. 2014a. Palms (Arecaceae) from Rio Grande do Sul, Brazil. *Rodriguesia* 65: 113-139.
- Soares, K. P.; Assis, L. C.; Guimarães, C. A. & Vieira, A. R. G. 2014b. Four new natural hybrids of *Syagrus* from Brazil. *Palms* 58: 87-100.
- Soares, K. P. & Assis, L. C. 2015. *Syagrus x cipoensis*, um nouvel hybrid du Minas Gerais, Brésil. *Princeps* 1: 115-124.
- Soares, K. P. & Guimarães, C. A. L. 2019. *Syagrus amicorum*, a new Arecaceae from Bahia, Brazil. *Phytotaxa* 38: 158–164.
- Soares, K. P.; Lorenzi, H.; Vianna, A. S.; Leitman, P. M.; Heiden, G.; Moraes, R. M.; Martins, R. C.; Campos-Rocha, A. & Sant'Anna-Santos, B. F. 2023. Arecaceae In Flora e Funga do Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Disponível em <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB53>. Acessado em 03 Março 2023.
- Tomlinson, P. B. 1961. **Anatomy of the monocotyledons: II palmae**. Clarendon Press, Oxford.
- Tomlinson, P. B, Horn, J. W & Fisher, J. B. 2011. **The anatomy of palms**. Clarendon Press, Oxford, 276p.
- Tournay, F. 2009. The Nabonnand Family and Palms. *Palms* 53: 119-123.
- Vallejo-Marín, M. & Hiscock, S. J. 2016. Hybridization and hybrid speciation under global change. *New Phytologist* 211: 1170-1187.
- Vianna, S. A. 2017. A new species of *Acrocomia* (Arecaceae) from Central Brazil. *Phytotaxa* 314: 45-54.
- Vianna, A. S.; Carmelo-Guerreiro, S. M.; Noblick, L. & Colombo, C. A. 2017. Leaf anatomy of *Acrocomia* (Arecaceae): an additional contribution to the taxonomic resolution of a genus with great economic potential. *Oesterreichische Botanische Zeitschrift* 303: 1-16.
- Vorster, P. 1990. \times *Butyagrus*, a new nothogeneric name for \times *Butyarecastrum* (Arecaceae). *Taxon* 39: 662.

Zhang, Y. & Wang, L. 2005. The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. **BMC Evolutionary Biology** 5: 1.

Zolet, A. C. T.; Segatto, A. L. A.; Turchetto, C.; Silva, C. P. D. & Freitas, L. B. D. 2013. **Guia prático para estudos filogeográficos.** Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/100134/000931668.pdf> Acesso em: 03 março 2023.

ANEXO I – Relativo ao Manuscrito 1

Table S1. Detailed information for each voucher of *×Butyagrus nabonnandii*, *Butia odorata* and *Syagrus romanzoffiana* has deposited in the Bruno Edgar Irgang Herbarium (HBEI) at the Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA).

Species	Voucher	Country/ State	Municipality	Geographic Coordinate	Collector
<i>×B. nabonnandii</i>	HBEI 1638	Brazil/Rio Grande do Sul	Venâncio Aires	29°33'47.87"S 52°09'06.32"W	Oliveira-Neves, P. <i>et al.</i>
<i>B. odorata</i>	HBEI 1647	Brazil/Rio Grande do Sul	Venâncio Aires	29°34'09.89"S 52°11'08.54"W	Oliveira-Neves, P. <i>et al.</i>
<i>S. romanzoffiana</i>	HBEI 1648	Brazil/Rio Grande do Sul	Venâncio Aires	29°34'10.32"S 52°11'08.46"W	Oliveira-Neves, P. <i>et al.</i>
<i>×B. nabonnandii</i>	HBEI 1641	Brazil/Rio Grande do Sul	Cachoeira do Sul	30°16'34.93"S 53°06'43.28"W	Oliveira-Neves, P.; Rosa, L.Z.
<i>B. odorata</i>	HBEI 1651	Brazil/Rio Grande do Sul	Cachoeira do Sul	30°16'35.48"S 53°06'40.18"W	Oliveira-Neves, P.; Rosa, L.Z.
<i>S. romanzoffiana</i>	HBEI 1650	Brazil/Rio Grande do Sul	Cachoeira do Sul	30°16'33.85"S 53°06'43.77"W	Oliveira-Neves, P.; Rosa, L.Z.
<i>×B. nabonnandii</i>	HBEI 1640	Brazil/Rio Grande do Sul	Porto Alegre	30°01'58.5"S 51°13'48.6"W	Rosa, L.Z.
<i>×B. nabonnandii</i>	HBEI 1668	Brazil/Rio Grande do Sul	Porto Alegre	30°12'15.2"S 51°05'49.0"W	Oliveira-Neves, P.; Lemos, G.

Contin. Table S1. Detailed information for each voucher of *×Butyagrus nabonnandii*, *Butia odorata* and *Syagrus romanzoffiana* has deposited in the Bruno Edgar Irgang Herbarium (HBEI) at the Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA).

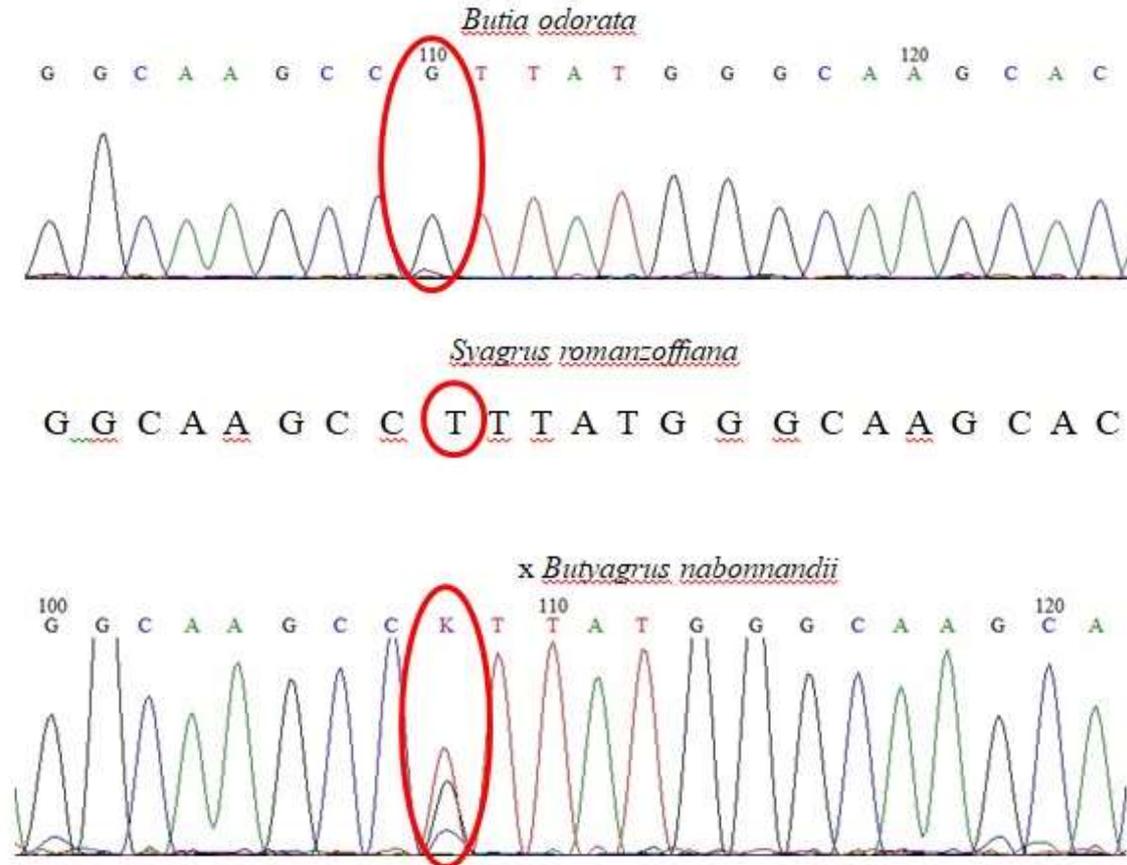
Species	Voucher	Country/ State	Municipality	Geographic Coordinate	Collector
<i>B. odorata</i>	HBEI 1653	Brazil/Rio Grande do Sul	Porto Alegre	30°03'04.50''S 51°10'36.03''W	Oliveira-Neves, P.; Lemos, G.
<i>S. romanzoffiana</i>	HBEI 1654	Brazil/Rio Grande do Sul	Porto Alegre	30°03'09.26''S 51°10'38.90''W	Rosa, L.Z.
<i>×B. nabonnandii</i>	HBEI 1642	Brazil/Rio Grande do Sul	Manoel Viana	29°35'25.9''S 55°29'14.5''W	Oliveira-Neves, P.; Azambuja, M.
<i>×B. nabonnandii</i>	HBEI 1644	Brazil/Rio Grande do Sul	Manoel Viana	29°35'32.94''S 55°29'7.13''W	Oliveira-Neves, P.; Azambuja, M.
<i>B. odorata</i>	HBEI 1652	Brazil/Rio Grande do Sul	Manoel Viana	29°35'32.94''S 55°29'7.12''W	Oliveira-Neves, P.; Azambuja, M.
<i>S. romanzoffiana</i>	HBEI 1645	Brazil/Rio Grande do Sul	Manoel Viana	29°35'27.5''S 55°29'6.5''W	Oliveira-Neves, P.; Azambuja, M.
<i>×B. nabonnandii</i>	HBEI 1663	Brazil/Rio Grande do Sul	São Vicente do Sul	29°41'39.33''S 54°41'44.46''W	Oliveira-Neves, P. <i>et al.</i>

Contin. Table S1. Detailed information for each voucher of \times *Butyagrus nabonnandii*, *Butia odorata* and *Syagrus romanzoffiana* has deposited in the Bruno Edgar Irgang Herbarium (HBEI) at the Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA).

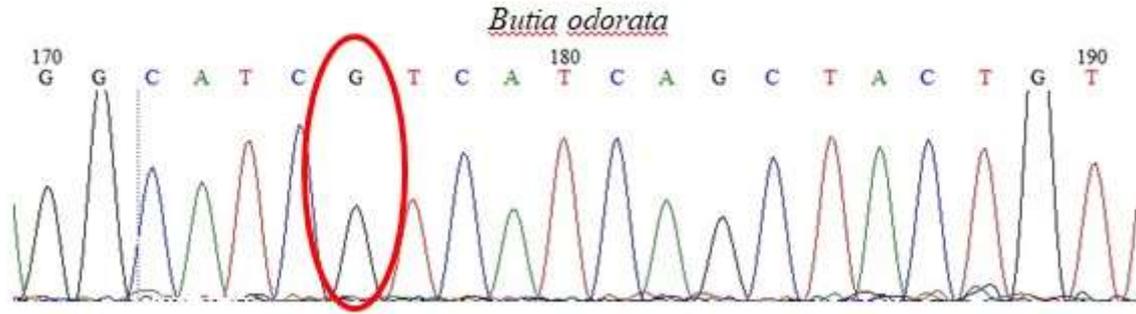
<i>B. odorata</i>	HBEI 1664	Brazil/Rio Grande do Sul	São Vicente do Sul	29°41'39.11"S 54°41'44.45"W	Oliveira-Neves, P. <i>et al.</i>
<i>S. romanzoffiana</i>	HBEI 1665	Brazil/Rio Grande do Sul	São Vicente do Sul	29°41'56.74"S 54°41'34.15"W	Oliveira-Neves, P. <i>et al.</i>

ANEXO II – Relativo ao Manuscrito 3

Esferogramas referentes aos fragmentos da sequência do locus WRKY-12 para ×*Butyagrus nabomandii*, *Butia odorata* e *Syagrus romanzoffiana*, mostrando os SNPs observados nas sequências do híbrido, indicando a possível hibridização entre as espécies parentais. Segundo IUPAC, letra R (nucleotídeo G ou A); letra K (nucleotídeo G ou T). Sequência do *S. romanzoffiana* tirada do GenBank (FJ957275.1).

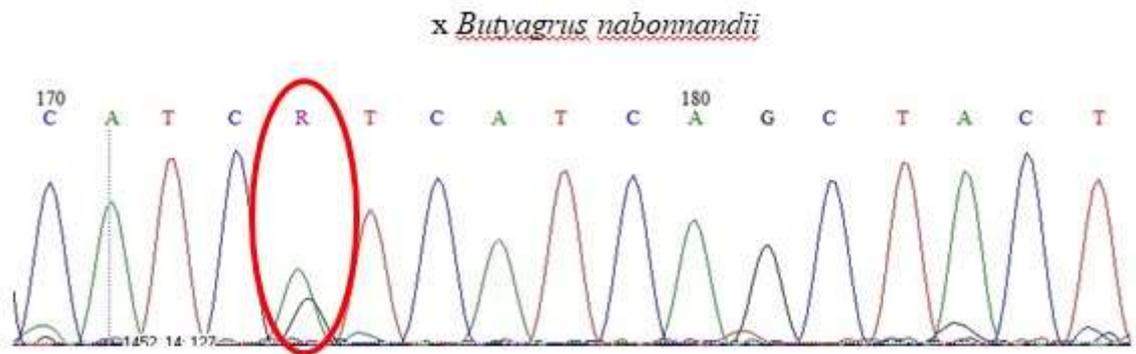


Fonte: Autores

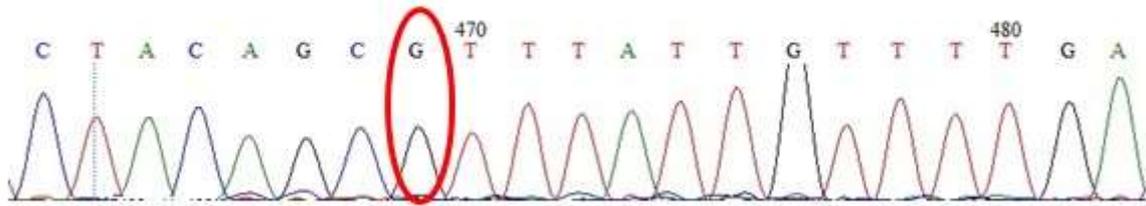


Syagrus romanzoffiana

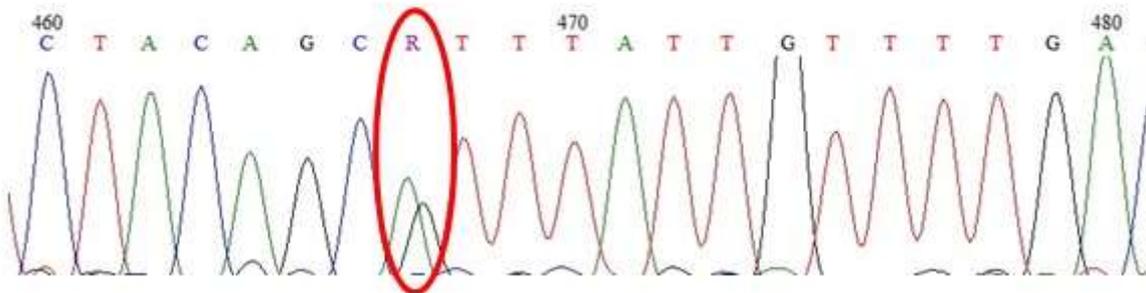
C A T C A T C A T C A G C T A C T G T



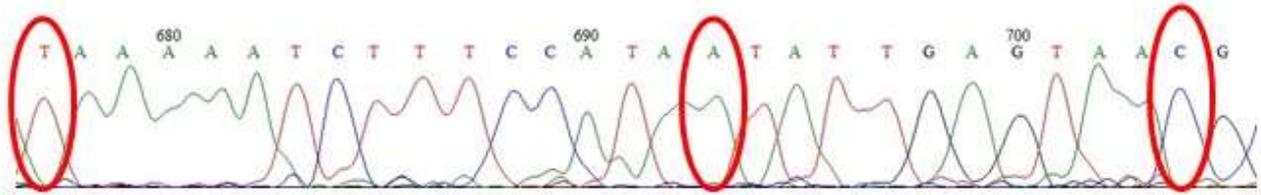
Fonte: Autores

Butia odorata*Syagrus romanzoffiana*

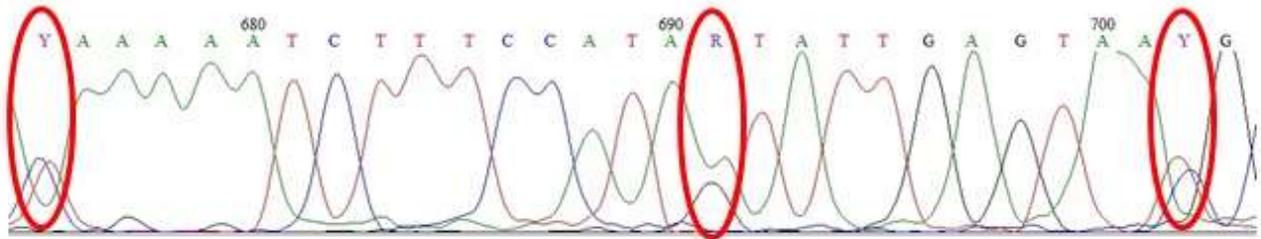
C T A C A G C A T T T A T T G T T T T G A

x *Butyragrus nabomandii*

Fonte: Autores

Butia odorata*Syagrus romanzoffiana*

C * A A A A T C T T T C C A T A G T A T T G A G T A A T G

x *Butyragrus nabomandii*

Fonte: Autores