

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Uso de DNA barcode para identificação de espécies de palmito como ferramenta para a genética forense**

CRISTINA CORRÊA TODESCHINI

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Fernanda Bered

Porto Alegre, março de 2019.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Uso de DNA barcode para identificação de espécies de palmito como ferramenta para a genética forense**

CRISTINA CORRÊA TODESCHINI

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Fernanda Bered

Porto Alegre, março de 2019.

# Agradecimentos

Agradecer não é o suficiente, mas é a forma como tenho para expressar sua importância na minha vida, mesmo que seja durante anos ou minutos, cada instante foi essencial para que no decorrer da minha caminhada eu me encontrasse agora onde estou.

Agradeço a vocês meus amados, pai Fernando, mãe Maria Idelma e irmãos Fernando, Victor e Débora que durante toda minha existência sempre me apoiaram, me deram força quando eu achava obstáculos difíceis demais e sempre foram exemplos para mim. A toda minha família obrigada pelo amor incondicional.

Agradeço a ti, minha querida orientadora, professora Fernanda Bered, por toda sua dedicação, paciência, empenho e esforço para que eu me tornasse melhor como pessoa e como profissional. Muito obrigada por todas as oportunidades e por sua confiança em mim. Serei eternamente grata.

Agradeço a vocês, professores, colegas e amigos do Núcleo de Genética e Conservação de Plantas da UFRGS sem os quais esse trabalho não existiria, obrigada pela ajuda, pela disposição, responsabilidade e trabalho em conjunto. Foi um prazer conviver com vocês, dividindo as angústias de quando os experimentos davam errados e as alegrias de quando tudo dava certo. Em especial agradeço a Camila Aguiar, Laís Mara e Luíza Hirsch pela amizade e por dias de trabalho mais sorridentes e divertidos.

Agradeço ao Henrique Galdino e, novamente à Laís Mara e Camila Aguiar, que me ajudaram em etapas cruciais do projeto.

A vocês, meus queridos amigos, Aline, Andressa, Breno, Bruno, Clarissa, Fabrício e sua família, Fran, Gabriel, Gija, Kellen, Laura e sua família, Otto, Victor, e tantos outros, o meu muito obrigada por me darem força, me incentivarem e acreditarem em mim. Por nas horas tristes e felizes estarem ao meu lado, por compreenderem minha ausência e estarem sempre de braços abertos para me receber. Por todas as conversas e esparecimento nos finais de semana.

Agradeço ao CNPq e ao Toni pelo suporte financeiro fundamental na execução deste trabalho.

Muito obrigada a todos por mais uma etapa da minha vida ser concluída, cada um teve sua participação no meu crescimento.

*“A felicidade só é real quando compartilhada.” - H. David Thoreau*

# Sumário

Resumo.....	5
Abstract.....	7
1. Introdução.....	9
1.1 Aspectos Gerais.....	10
1.1.1 Família Arecaceae.....	10
1.1.2 Palmeira Juçara.....	12
1.1.3 Palmeira Açaí.....	13
1.1.4 Palmeira Pupunha.....	16
1.1.5 Palmeira Real.....	17
1.2 Comércio e Qualidade de Palmitos.....	18
1.3 Caracterização do Problema.....	20
1.4 Identificação de Espécies.....	21
1.5 Marcadores Moleculares – DNA Barcode.....	22
i. DNA Barcode.....	22
ii. Extração de DNA.....	28
1.6 Objetivos.....	30
2 Artigo.....	32
Abstract.....	33
Introduction.....	34
Material and Methods.....	35
Results.....	37
Discussion.....	39
Tables and Figures.....	44
3. Considerações Finais.....	80
4. Referências Bibliográficas.....	83

## Resumo

O palmito pode ser obtido de diferentes espécies de palmeiras. Compõe-se basicamente das folhas não desenvolvidas imediatamente acima do meristema apical, responsável pelo desenvolvimento da palmeira. Atualmente, o Brasil é responsável por 95% da produção mundial de palmito e também é um grande consumidor. A maior parte da produção de palmito vem das palmeiras do gênero *Euterpe*. Devido à ampla distribuição natural e alta densidade populacional, a espécie *Euterpe edulis* Mart. e *Euterpe oleracea* Mart. foram exploradas para este fim em um nível predatório. Essa exploração contribui para a degradação do meio ambiente e tornou-se um fator preocupante para a preservação, principalmente, de *E. edulis*, uma vez que não há rebrotação, pois apresenta um único caule. O presente estudo é uma iniciativa para reforçar a necessidade de um programa de regulação baseado na identificação por DNA *barcode* de espécies comercializadas irregularmente como palmito em conserva nos mercados do Sul do Brasil. Os DNA *barcode* geralmente se referem a sequências curtas de DNA, que podem ser usadas para identificar espécies com rapidez e precisão. Além da identificação das espécies, os DNA *barcode* também podem melhorar ou complementar a taxonomia tradicional baseada em caracteres morfológicos. Um *barcode* ideal deve obedecer a três critérios: universalidade, facilidade de amplificação e sequenciamento; qualidade da sequência; e poder discriminatório. Neste estudo, o objetivo geral foi distinguir quatro espécies utilizadas como palmito (*E. edulis*, *E. oleraceae*, *Bactris gasipaes* e *Archontophoenix cunninghamiana*) tanto *in natura* quanto em palmito em conserva. Como recomendado pelo CBOL Plant Working Group, foram avaliados os marcadores individualmente e também combinados. Foram utilizados três marcadores de cloroplasto, candidatos a DNA *barcode*: *rps16-trnk*, *trnL-trnF* e *rpl32-trnL*, e o marcador nuclear: *ITS2*, para comparar as quatro espécies de acordo com o sucesso da amplificação, poder de discriminação e divergência inter e intraespecífica. Os resultados mostraram que o marcador *rpl32-trnL* pode ser usado individualmente como um *barcode*, bem como marcadores concatenados para distinguir essas espécies de plantas, enquanto que para animais somente o *COI* (cytochrome oxidase I) é necessário. A alta qualidade e pureza do DNA isolado de produtos processados são fatores essenciais para a identificação de espécies e podem afetar a análise. Neste estudo, dois métodos foram principalmente testados para a extração de DNA: Dnaesymericon Food Kit e o método CTAB com modificações; após, as etapas de amplificação e sequenciamento foram realizadas. Além disso, os principais fatores que influenciam o sucesso da amplificação por PCR são o tamanho do fragmento amplificado e o status de processamento do alimento, que pode envolver superaquecimento dos tecidos, compostos químicos, tempo de armazenamento e contaminação, causando degradação do DNA. Fragmentos curtos e produtos não processados resultam em taxas de sucesso mais altas. No que diz respeito ao marcador *ITS2*, este pôde ser amplificado para todas as espécies processadas deste estudo, mas sequenciado apenas para *E. edulis*, *E. oleraceae* e *Bactris gasipaes*.

Para o marcador *trnL-trnF*, apenas as amostras processadas de *E. oleraceae* foram amplificadas e sequenciadas com sucesso, e somente para este marcador o método baseado na árvore de NJ pôde ser realizado com sucesso. A implementação de tais programas regulatórios usando tecnologias inovadoras, como os métodos de identificação baseados em DNA, pode desencorajar a substituição deliberada no mercado de palmito e levar a uma redução significativa na rotulagem errada do produto.

## Abstract

Heart-of-palm can be harvested from different species of palms. It is basically composed of the unexpanded leaves immediately above the apical meristem, responsible for the development of the palm tree. Currently, Brazil is accountable for 95% of the world production of palm heart, and is also a major consumer. Most of the heart-of-palm production comes from palms of the *Euterpe* genus. Due to wide natural distribution and high population density, the species *Euterpe edulis* Mart. and *Euterpe oleracea* Mart. have been exploited for this purpose in a predatory level. This exploitation contributes to the degradation of the environment and has become a concern factor for the preservation, mainly, of *E. edulis*, since there is no regrowth, as it presents a single stem. Here we report an initiative to enforce a regulatory program based on DNA Barcode identification of mislabeled palm heart products commercialized in Southern Brazil market places. DNA barcodes generally refer to short DNA sequences, which can be used to rapidly and accurately identify species. Besides species identification, DNA barcodes have also been deemed to improve or supplement traditional taxonomy based on morphological characters. An ideal barcode must conform to at least three criteria: universality, ease of amplification and sequencing; sequence quality; and discriminatory power. In this study, we attempted to distinguish four species used as palm heart (*E. edulis*, *E. oleraceae*, *Bactris gasipaes* and *Archontophoenix cunninghamiana*) both in natura and processed palm heart. As recommended by the CBOL Plant Working Group, we evaluated not only individual markers, but also the combination of them as plant barcode. Our method includes three chloroplast markers, candidates as DNA barcode markers: *rps16-trnK*, *trnL-trnF* and *rpl32-trnL*, and the nuclear marker: *ITS2*, to compare the four species according to amplification success, discrimination power and inter- and intra-specific divergence. Our results showed that *rpl32-trnL* can be used individually as a barcode as well as concatenated markers to distinguish plant species, while for animals only the *COI* (cytochrome oxidase I) is needed. High quality and purity of DNA isolated from processed products is essential for species identification and has unpredictable influences and effect the analysis. In this study, two mainly methods were tested for DNA extraction: Dnaesymericon Food Kit and CTAB method with modifications, and then the amplification and sequencing steps were performed. Moreover, main factors influencing the success of PCR amplification are the size of the amplified fragment and the processing status of the food, that may involve overheating of tissue, chemical compounds, time of storage and contamination, causing DNA degradation. Short fragments and unprocessed products result in higher success rates. Concerning *ITS2* marker, it could be amplified for all the processed species of this study, but sequenced only for *E. edulis*, *E. oleraceae* and *Bactris gasipaes*. For the *trnL-trnF* marker, only the processed samples of *E. oleraceae* could be successfully amplified and sequenced, and only for this marker the NJ tree-based method could be performed with success. The implementation of such regulatory

programs using innovative technologies, such as DNA based identification methods, may discourage deliberate replacement in the palm heart market and lead to a significant reduction in palm heart mislabeling.



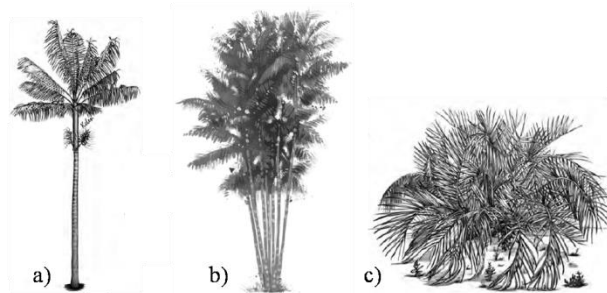


## 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos Gerais

### 1.1.1 Família Arecaceae

A família das palmeiras, Arecaceae, forma um dos principais ramos da evolução das monocotiledôneas, sendo a única família botânica da ordem Arecales. É constituída atualmente por 252 gêneros e aproximadamente 3.500 espécies (Dransfield *et al.*, 2008; Lorenzi *et al.*, 2010). No Brasil, ocorrem naturalmente 37 gêneros e cerca de 300 espécies (Flora do Brasil 2020). Algumas são conhecidas por nomes vulgares que as identificam satisfatoriamente, mas muitas não os possuem ou se possuem dão origem a uma grande confusão por serem aplicados a plantas totalmente diferentes. Por esse motivo, devem sempre ser conhecidas pelo seu nome botânico (Lorenzi *et al.*, 2010). As palmeiras são plantas perenes, arborescentes, podendo ter um único caule cilíndrico não ramificado do tipo estipe, atingindo grandes alturas, mas por vezes se apresentam como acaules (caule subterrâneo) ou em touceira (Figura 1). A maioria das espécies possui caule simples, solitário de altura e espessura variáveis. São alongados, cilíndricos ou colunares, geralmente sem ramificações e ostentam no ápice um tufo de folhas. Não são consideradas árvores, porque todas as árvores possuem o crescimento do diâmetro do seu caule para a formação do tronco, ou seja, não há o crescimento secundário do caule, que produz a madeira e isso não acontece com as palmeiras (Lorenzi *et al.*, 2010). O tronco das palmeiras é duro e não possui casca como nas árvores dicotiledôneas, onde, por serem dotadas de câmbio, aumentam seu diâmetro por acréscimo de um novo anel ou de uma nova camada. Nas palmeiras, a medula central é esponjosa e cercada por um anel protetor, forte, de fibras que formam numerosos feixes verticais de tecido condutor, xilemas e floemas. Porém, sendo destituído do tecido cambial, uma vez formado, não haverá aumento de diâmetro. A região principal de crescimento está situada no ápice caulinar, onde se localiza a gema terminal com seu tecido meristemático. É por ela que o tronco alonga-se e dilata-se na base das folhas, mediante deposição de novas células de dentro para fora. Por essa razão, muitas palmeiras alcançam o máximo de diâmetro do tronco quando são ainda jovens, antes de começar a alongar-se (Lorenzi *et al.*, 2010).



**Figura 1:** Diferentes morfologias dos estipes das palmeiras. a) Estipe único; b) Estipes múltiplos ou em touceira; c) acaule ou com caule subterrâneo.

A família Arecaceae teve, no Terciário (Eoceno), o auge de sua diversificação e dispersão pelo planeta, ocupando todos os atuais continentes. Nem sempre foram tropicais, pois palmeiras que hoje estão limitadas às regiões da Ásia Tropical ocorriam na Europa Ocidental e atualmente diversas espécies ainda são encontradas fora das regiões subtropicais (Soares *et al.*, 2014). Essas espécies são de grande interesse para o paisagismo das regiões temperadas, onde o uso de palmeiras é muito restrito (Lorenzi *et al.*, 2010). Atualmente, as palmeiras ocorrem em regiões variáveis quanto ao clima e solo, porém é na região equatorial que há o maior número de espécies, especialmente na Malásia, Ásia tropical e América equatorial (Bondar, 1964; Henderson *et al.*, 1995; Lorenzi *et al.*, 2010). Aproximadamente 75% das espécies estão distribuídas nas florestas tropicais (Dransfield, 1978; Uhl & Dransfield, 1987). No Brasil, a chamada Zona dos Cocais abrange extensas regiões, do norte e nordeste em direção ao centro, caracterizando-se pelos babaçuais, carnaubais e buritizais, e em direção ao oeste os carandasais. As demais regiões do país são um verdadeiro mosaico, na Amazônia ocorrem buritis, tucumãs, inajás, marajás, jarinas, açais; no centro os jerivás, macaúbas, guarirobas, bacuris; do centro para o sul os jerivás, juçaras, butiás; no centro-leste os licuris, buris; certos trechos da Serra do Mar pelos indaiás do litoral, pindobas, patis, guaricangas, icás, brejaúvas e à beira-mar pelos guriris, tucuns; e em cerrados do centro, os indaiás do campo. É assim plenamente justificada a denominação “pindorama”, aplicada pelos indígenas para designar o território ocupado no país pelas palmeiras (Lorenzi *et al.*, 2010).

A sistemática da família é tradicionalmente baseada nas características morfológicas dos estipes, das folhas, dos frutos, das flores, nas particularidades anatômicas dos seus órgãos, e pouco fundamentada nas características citológicas e histológicas, estudos das distribuições geográficas atuais e história da evolução da família e seus gêneros (Henderson *et al.*, 1995; Dransfield *et al.*, 2008). As palmeiras representam a terceira família botânica mais importante para o ser humano (Johnson, 1998). Possuem grande produtividade e diversidade de usos, sendo de grande importância alimentar, paisagística, medicinal, sócio-cultural e econômica para populações locais (Zambrana *et al.*, 2007). Palmeiras fornecem recursos como palha, materiais para construção e artesanato, e na medicina (Balslev & Barfod, 1987; Balick, 1988; Johnson, 1996; Borchsenius *et al.*, 1998; Svenning & Balslev, 1998), tendo sido uma importante fonte de alimento por, pelo menos, 11.000 anos (Roosevelt *et al.*, 1996). A seiva de algumas espécies de areáceas é tradicionalmente fermentada para produzir o vinho de palma, muito apreciado e conhecido em Moçambique com o nome de "sura", onde, além de ser bebido, é também utilizado como fermento na fabricação de pães e bolos (D'Elboux, 2006).

A importância ecológica das palmeiras tem uma longa história nas Américas, onde a vegetação dominada por palmeiras existe há pelo menos 71 milhões de anos (Wing *et al.*, 1993). São um componente importante dos ecossistemas das florestas tropicais e neotropicais, sendo muitas vezes abundantes no

dossel, bem como nos estratos inferiores (Balslev *et al.*, 1987; Kahn & de Granville, 1992; Peres, 1994; Terborgh *et al.*, 1996; Borchsenius, 1997; Borchsenius *et al.*, 1998). São notórias para dominar habitats mal drenados ou inundados (Beard, 1944; Kahn & de Granville, 1992). Não só as palmeiras têm um significado estrutural, como também suas sementes e frutos são importantes recursos alimentares para muitos invertebrados e vertebrados, e algumas espécies são consideradas espécies-chave para frugívoros (Uhl & Dransfield, 1987; Kahn & de Granville, 1992; Peres, 1994; Johnson, 1996).

Apesar do uso para diversas finalidades, são consideradas domesticadas somente cinco espécies da família: a arequeira (*Areca catechu* Linnaeus), o coqueiro (*Cocos nucifera* Linnaeus), o dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq), a tamareira (*Phoenix dactylefera* Linnaeus) e a pupunheira, (*Bactris gasipaes* Kunth) (Clement, 1992; Meyer *et al.*, 2012).

### 1.1.2 Palmeira Juçara

*Euterpe edulis* Mart., popularmente conhecida como palmito-juçara, juçara, jiçara, içara, palmitero-doce, ençarova, ripa e palmitero, é uma palmeira não estolonífera (estipe único) (Figura 2). O tronco atinge em média 15m de altura e 15cm de diâmetro à altura do peito (DAP). Suas folhas são pinadas com cerca de 2,0 a 2,5m de comprimento e destacam-se com facilidade da planta. Apresenta inflorescências com ráquis com cerca de 70cm de comprimento, com muitas ráquias contendo flores em tríade (uma flor feminina e duas masculinas). As flores masculinas amadurecem antes das femininas (protandria), um mecanismo que promove a fecundação cruzada entre indivíduos. A polinização é feita principalmente por insetos (entomófila), e a dispersão dos frutos por animais (zoocoria) (Reis, 1995). Os frutos são drupáceos, esféricos, de cor quase preta ou negro-vinosa quando maduros, com mesocarpo carnosos muito fino (Reitz, 1974). *Euterpe edulis* ocorre da Bahia ao Rio Grande do Sul, sendo encontrada no estrato médio da Floresta Ombrófila Densa (Floresta Tropical Atlântica), onde por vezes apresenta-se como dominante. Na Floresta Estacional Decidual, a espécie se mostra mais rara, restringindo-se a pequenos relíctos (Sobral *et al.*, 2006).

Como é uma palmeira com haste única, é necessário matar toda a planta para obter o palmito. No sistema seletivo tradicional, todas as plantas com mais de 2 m de altura são colhidas e poucas ou nenhuma planta reprodutiva é poupada. Nos melhores regimes de colheita, apenas os indivíduos com mais de 8 cm de DAP são cortados; no entanto, a maioria dos indivíduos reprodutivos também é colhida. Estes sistemas de exploração podem resultar em erosões genéticas substanciais das populações e não permitir a manutenção de uma estrutura demográfica que favoreça a regeneração natural (Reis *et al.*, 2000). O declínio na densidade populacional dentro das florestas exploradas foi observado em muitas regiões (Reitz

*et al.*, 1978, Guerra *et al.*, 1984). Em casos extremos, a espécie foi eliminada localmente, como foi observado em alguns fragmentos florestais em Guaraqueçaba, no Paraná (Reis *et al.*, 2000).

As possibilidades de exploração do fruto da palmeira juçara não estão restritas aos ecossistemas naturais de ocorrência da espécie. O maior potencial para extração de seus frutos está concentrado nos quintais rurais, com produção de grandes cachos de frutos e facilidades de colheita. Por exemplo, enquanto uma palmeira juçara na floresta produz em média dois cachos (Reis, 1995), as plantas a céu aberto cultivadas em fundo de quintal, jardins e bordas de mata podem produzir até seis cachos. Além disso, resultados da exploração dos frutos em quintais agroflorestais e em bananais apresentados por Mac Fadden (2005), sugerem que o cultivo da palmeira juçara em consórcio com a bananeira ou mesmo em quintais agroflorestais é uma prática viável que apresenta bons rendimentos para produção de frutos. A palmeira juçara representa um elemento a mais no monocultivo de banana, aumentando a diversificação da produção local.

Uma vantagem significativa da produção de frutos é que ela não implica na morte da planta, como acontece no caso da extração do palmito. Diferente da produção do palmito, que ocorre uma única vez para cada palmeira, a produção de frutos pode ocorrer todos os anos, durante um longo período, representando uma fonte de renda anual para os produtores, indiscutivelmente uma característica altamente desejável em um produto florestal. Além disso, a extração dos frutos da palmeira juçara, não destrói o poder germinativo das sementes, pelo contrário, acelera a sua germinação, pois os frutos utilizados neste processamento são frutos maduros. Também, como um importante recurso alimentar, o palmitreiro pode ajudar a acelerar a sucessão em florestas secundárias. Ao atrair dispersores de sementes, como aves e mamíferos, a *E. edulis* indiretamente aumenta a chegada de novas sementes provenientes de manchas florestais vizinhas (Reis, 1993; Galetti & Aleixo, 1998).

O status *in situ* da espécie é bastante delicado devido à intensa exploração extrativista de palmito ao longo dos anos. *Euterpe edulis* aparece como espécie “em perigo” de extinção em quase todas as unidades federativas em que ocorre (Brasil, 2008). Adicionalmente, existe grande pressão para a substituição das áreas de ocorrência natural da espécie para outros usos da terra. Assim, a mudança da exploração de *Euterpe edulis* da produção de palmito para a produção do seu fruto tem vantagens e deve se consolidar como uma renovada esperança para agricultores de palmeiras (Coradin *et al.*, 2011).

### 1.1.3 Palmeira Açaí

*Euterpe oleracea* Mart., popularmente conhecida como açaí, açaí-de-touceira, açaí-do-Pará, açaí-verdadeiro, é uma palmeira cespitosa, com até 25 perfilhos (brotações) por touceira (Figura 2). As plantas

adultas têm estipes de 3 a 20 m de altura e 7 a 18 cm de diâmetro. As folhas são compostas, pinadas com arranjo espiralado de 40 a 80 pares de folíolos. A inflorescência do tipo cacho possui flores estaminadas e pistiladas. A disposição das flores é ordenada em tríades, de tal forma que cada flor feminina fica ladeada por duas flores masculinas. O fruto do açazeiro é uma drupa globosa, de 1 a 2 cm de diâmetro e peso médio de 1,5 gramas. O epicarpo, dependendo do tipo, é roxo ou verde na maturação. O mesocarpo polposo (cerca de 1 mm de espessura) envolve o endocarpo volumoso e duro que acompanha a forma do fruto e contém a semente em seu interior. Popularmente o que chamam de semente é o pirênio, pois a semente é ainda envolvida pelo endocarpo. A semente apresenta na maturação um endosperma sólido do tipo ruminado e um embrião pequeno, mas desenvolvido. O sistema radicular é do tipo fasciculado, com raízes emergindo do estipe da planta adulta até 40 cm acima da superfície do solo (Nascimento, 2008).

A palavra açai é de origem tupi – yá-çai - e significa fruto que chora, ressuma ou deita água, provavelmente relacionado ao fato de que durante o processo de extração da polpa, esta flui lentamente, em forma de grandes gotas, tanto quando extraída manualmente como quando extraída em pequenas máquinas despoldadoras, de largo uso na Amazônia (Braga, 1976).

O açazeiro ocorre no Brasil, nos estados do Amapá, Maranhão, Pará (Calzavara, 1972; Cavalcante, 1991), Tocantins (Balick, 1986a) e no Mato Grosso (Macedo, 1995). Também se distribui na Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Venezuela (Calzavara, 1972; Roosmalen, 1985; Cavalcante, 1991) e Colômbia (Balick, 1986b). Distribuição mais ampla é apresentada por Henderson & Galeano (1996), que assinalam a presença dessa palmeira, também, no Panamá, Equador e Trinidad. Entretanto, as maiores áreas ocupadas com essa espécie encontram-se na Amazônia Oriental brasileira, mais precisamente na região do estuário do rio Amazonas (Pará), considerada como seu centro de origem e onde se encontram densas e diversificadas populações que ocupam terrenos submetidos a inundações periódicas (Oliveira, 1995). É também encontrado em áreas permanentemente alagadas e em terra firme (Cavalcante, 1991), embora em densidades bem menores. Somente no estuário do grande rio Amazonas, densas populações nativas de açazeiro, ocupam área em torno de 1.000.000 ha (Calzavara, 1972).

A espécie é típica de floresta bem desenvolvida, cresce lentamente, necessita muita umidade, mas uma baixa exigência de luz, mesmo para o desenvolvimento das plântulas. A dispersão das sementes pode ser feita por aves de médio a grande porte, roedores e mesmo pela água quando o local for susceptível às enchentes. Muitas plântulas não sobrevivem à competição principalmente intraespecífica. Após alcançar 1 m de altura ou 2 a 3 anos de vida, nota-se geralmente o início do crescimento do estipe (Nascimento, 2008).

Os dois principais produtos originários da espécie, o palmito e o fruto, são usados na alimentação humana. A polpa de açaí é largamente usada na produção industrial ou artesanal de sorvetes, geleias e licores. Outros produtos têm surgido no mercado, tais como: açaí pasteurizado ou em combinações com xarope de guaraná e doce de leite ou ainda açaí em pó solúvel (Nascimento, 2008). O fruto do açaizeiro somente é consumido após processamento, pois apresenta escasso rendimento de parte comestível e sabor relativamente insípido, quando comparado com a maioria das frutas tropicais tradicionalmente consumidas como fruta fresca (Oliveira *et al.*, 2000).

Quanto à produção de palmito, o número de touceiras e estipes por hectare é o parâmetro que melhor define a produtividade (Carim *et al.*, 2014). Segundo Bovi *et al.* (2004), quanto maior o número de perfilhos menor será a produção individual do estipe. Para Nogueira *et al.* (2004), o diâmetro dos estipes é um parâmetro fundamental para estimar a produção de palmito aproveitável, pois, segundo o autor, citando Moreira & Nogueira (1994), para a obtenção de um palmito de primeira qualidade é necessário que o açaizeiro esteja, no mínimo, com sete centímetros de DAP. Bovi *et al.* (1990) sugerem que o desenvolvimento do palmito está intimamente correlacionado ao diâmetro da palmeira, desta forma, pode-se traçar um perfil de produtividade em açazais nativos para o manejo sustentável visando fruto e palmito. Os mesmos autores indicam que o DAP mantém correlação diretamente proporcional ao peso e diâmetro do palmito. Desta forma, pode-se planejar o corte segundo o tamanho da planta. Para Pollak *et al.* (1996), a relação diâmetro e altura do estipe estão perfeitamente relacionados à produtividade do palmito, sendo assim, pode-se estimar o tamanho do palmito que um estipe qualquer renderá e vice-versa. Para este autor, a produção de frutos não obedece a um padrão específico que se possa correlacionar vegetativamente. Estipes com a parte lenhosa exposta geralmente são produtivos, e está intimamente relacionado com a entrada de luminosidade no ambiente de certa forma o fotoperíodo é o fator limitante para produção de frutos de açaizeiros nas áreas de várzea. Além disso, após quatro anos da extração do palmito os açazais podem ser novamente aproveitados para a produção de frutos ou palmito.

Há um consenso entre diversos estudos sobre a crescente transformação sofrida na cadeia produtiva do açaí, deixando de ser produtora de palmito para atender a demanda crescente pela polpa, antes tido como subproduto destinado a subsistência dos ribeirinhos, exigindo novas adoções para aumento de produtividade de frutos (Anderson & Ioris, 2001; Queiroz & Mochiutti, 2001; Arzeni & Jardim, 2004; Simonian, 2004). No início da década de 90, tal fato chegou a representar uma ameaça de desequilíbrio ecológico. Fatores ligados ao aumento vertiginoso da demanda pelo açaí impulsionaram as práticas de manejo intensivo dos açazais com a eliminação das espécies consideradas de baixo valor comercial, que ocorrem naturalmente nas áreas de várzea, implicando, contrariamente ao que se previa em uma ameaça a comunidade florestal como um todo (Carim *et al.*, 2014).

Além desses usos, são grandes as perspectivas de utilização na indústria de corantes naturais (Nazaré *et al.*, 1996), vista a tendência mundial de proibição de muitos corantes sintéticos, particularmente os que apresentam efeitos cancerígenos. Os corantes extraídos do açaí têm sido utilizados, experimentalmente, no preparo de bombons e gelatina, com excelentes resultados (Nazaré & Ribeiro, 1998). Com relação ao segmento de bebidas isotônicas, o produto com sabor artificial de açaí já é encontrado nas prateleiras das grandes redes de supermercado que atuam no Brasil, sendo um bom indicativo de aceitação do açaí pelo público. Na culinária doméstica também apresenta multiplicidade de usos sendo usada na elaboração de bolos, tortas, cremes, pudins e mousses (Oliveira *et al.*, 2000). Assim, a venda de polpa de açaí congelada para outros estados brasileiros vem aumentando significativamente com taxas anuais superiores a 30%, podendo chegar a cerca de 10 mil toneladas, além das quase mil toneladas exportadas anualmente para vários países na forma de mix ou mistura (açaí e guaraná). Esses fatos têm motivado a implantação do cultivo de açazais em terra firme (Queiroz & Mochiutti, 2001).

#### 1.1.4 Palmeira Pupunha

A pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth), popularmente conhecida como pupunha, pupunheira, pupunha-marajá, pirajá-pupunha, apresenta estípes múltiplos de até 20 m de altura, com espinhos formando anéis (Figura 2). Suas folhas são densamente armadas de espinhos negros. Os frutos maduros são de cor vermelha ou amarela e de forma e tamanho variáveis. É uma palmeira neotropical, ocorrendo desde a América Central até a Amazônia e sendo amplamente disseminada pelo homem (Lorenzi *et al.*, 2010). Apresenta populações domesticadas por nativos americanos (Clement, 1988), e ocorre em diferentes ambientes, preferindo terrenos secos, e exibe diferentes graus de domesticação (Mora-Urpi *et al.*, 1997). Na época da conquista européia, a pupunha foi uma importante cultura alimentar e a base de bebidas fermentadas.

O fruto é comestível e muito apreciado, sendo parte da dieta da população amazônica. Variedades da espécie, sem espinhos, estão sendo desenvolvidas e seu plantio está sendo incrementado no Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia, para produção de palmito. As aves também consomem o mesocarpo do fruto (Lorenzi *et al.*, 2010).

A pupunha para produção de palmito é uma alternativa para fonte de renda e agregação de valores. Devido à sua alta produtividade por unidade de área, o aumento na oferta de palmito cultivado representa também um decréscimo na pressão ainda existente sobre as populações remanescentes de juçara (*Euterpe edulis*) (Santos *et al.*, 2003). O palmito de pupunha apresenta várias vantagens sobre os tipos juçara e açaí, atuais dominantes do mercado. As principais vantagens são: a) o rápido crescimento, pois enquanto a pupunha demora de 18 a 24 meses para o seu primeiro corte, o açaí demora quatro anos e a juçara, oito; b)



capacidade de perfilhamento, onde a árvore emite brotações na base e pode ser cortada a cada 12 a 14 meses após o primeiro corte (no açaí os cortes têm intervalo de dois anos e na juçara, a árvore é destruída após o primeiro corte); c) maior rendimento por planta; d) não oxidação, o que representa uma grande vantagem no processo de beneficiamento; e) grande qualidade do palmito, geralmente o palmito tem comprimento de 40 cm e diâmetro entre 1,5 – 4 cm, sendo muito macio e saboroso; f) vantagens ecológicas, podendo a cultura ser conduzida a pleno sol, em áreas agrícolas tradicionais, sem nenhum dano às matas nativas, fato este de grande apelo comercial, principalmente para a exploração do palmito visando o mercado externo (Santos *et al.*, 2003).

### 1.1.5 Palmeira Real

A palmeira real (*Archontophoenix cunninghamiana* H. Wendl. & Drude), popularmente conhecida também como seafórtia, é uma palmeira exótica originária da Austrália, com estipe simples, de 8 a 10 m de altura e 18 cm em média de diâmetro, cilíndrico, não dilatado na base, com palmito grande, espesso e vistoso no topo (Figura 2). As folhas são pinadas, grandes, variáveis, pouco ou fortemente recurvadas, às vezes direitas, com folíolos longos, verdes, em ambas as faces. Sua inflorescência é arroxeadada, ramificada, grande, pendente. Os frutos são esféricos, vermelhos, pequenos. É cultivada a pleno sol e requer muito cuidado durante o transplante, mesmo com torrão (Lorenzi *et al.*, 2010). Além disso, se pode observar grande quantidade de pequenas mudas encontram-se sob a planta. Portanto, devido à facilidade de propagação, pode tornar-se invasiva nos locais onde é introduzida (Freitas *et al.*, 2007).

A espécie é cultivada com ampla frequência, tolerando clima temperado desde que de inverno moderado. Também é muito usada como ornamental (Lorenzi *et al.*, 2010). A palmeira-real, segundo Bovi (1998), apresenta características interessantes como resistência à forte insolação e ao frio, excelente paladar do palmito produzido, boa adaptação a solos degradados e significativo retorno financeiro ao capital investido.

A produção de palmito das espécies *Archontophoenix* é feita a partir de dois anos de campo, desde que cultivadas em regiões aptas e com adubação apropriada. As espécies tradicionais levam de 8 a 12 anos para estarem prontas para o corte. Por ser recomendada para plantio em pleno sol, elimina os problemas que os proprietários rurais têm enfrentado com a legislação existente para áreas cobertas com matas naturais, possibilitando ainda maior sistematização da cultura, através da mecanização (Bovi, 1998).

## 1.2 Comércio e Qualidade de Palmitos

A Floresta Tropical Atlântica, ou Mata Atlântica, possui uma biodiversidade comparável à da Floresta Amazônica, mas, apesar do alto potencial de manejo sustentável de várias espécies, esse ecossistema foi sistematicamente devastado, um processo que começou logo após a chegada dos primeiros europeus no século 16 (Dean, 1995). Remanescentes da floresta cobrem apenas nove por cento de seus 1,1 milhão de hectares originais (Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, 1998). Embora esses remanescentes sejam em sua maioria florestas secundárias fragmentadas, eles ainda abrigam um grande número de espécies, muitas das quais são endêmicas (Klein, 1979, 1980).



**Figura 2:** Espécies de palmeira comercializadas como palmito e incluídas no presente estudo.

O palmito, produto comestível extraído da extremidade superior do estipe de certas palmeiras, onde está o meristema apical e folhas indiferenciadas jovens, é uma iguaria fina de grande aceitação no mercado interno e externo, muito apreciado em diversos países (Bovi, 1998). O Brasil destaca-se quanto à industrialização de palmito em conserva acidificada e pasteurizada tanto pela quantidade processada quanto por suas pesquisas nesta área. Antes da década de 60, a produção básica de palmito vinha principalmente da costa meridional do país, sendo extraído da palmeira Juçara que, apesar da alta qualidade do palmito, apresenta corte tardio, rendimento baixo e exige sombra para crescer melhor. Além disso, trata-se de espécie em risco de extinção e que deveria ser protegida (Kulchetscki *et al.*, 2001). O Estado de São Paulo era então o primeiro produtor. O ritmo da exploração, sem o correspondente replantio, fez cair rapidamente o número de palmeiras nativas nessa região. Esta escassez de matéria-prima acarretou a mudança das maiores empresas processadoras de palmito para o estado do Pará, então com extensas reservas de açazeiros (Bovi, 1997).

Há uma grande diversidade de palmeiras potencialmente importantes para a produção de palmito. Cada uma delas apresenta características diferenciadas para sua produção e comercialização. Dentre elas estão as duas espécies nativas já mencionadas aqui e amplamente usadas para este fim. O uso racional de outras palmeiras para a produção de palmito tem sido uma das alternativas para diminuir a pressão de exploração sobre as espécies *Euterpe edulis* e *E. oleracea* (Bovi, 1998). Como já mencionado, dentre as várias palmeiras passíveis de serem cultivadas para esta finalidade, estão a pupunheira e a palmeira Real Australiana, devido principalmente às suas características de precocidade e rusticidade. Até recentemente, a palmeira real era utilizada em nosso país apenas como planta ornamental. O interesse por esta palmeira como produtora de palmito começou a partir dos anos de 1990, quando a exploração predatória da palmeira Juçara na região Sudeste do Brasil e do Açaí no Norte tinham alcançado o máximo e nossas reservas de palmito nativo já estavam bastante dilapidadas. Estudos efetuados com plantas dessas espécies atestam a viabilidade de seu cultivo no Brasil (Bovi, 1998).

Avaliações de alguns gêneros de palmeiras têm mostrado que a densidade de plantio pode influenciar os produtos de interesse, seja a planta como um todo, para fins ornamentais, ou subprodutos, como palmito ou óleos (Flori *et al.*, 2001; Neves *et al.*, 2002). A qualidade do palmito em conserva das diferentes espécies utilizadas foi estudada por alguns autores (Berbari *et al.*, 2008). Foram identificados e quantificados diversos atributos de qualidade, como: cor, uniformidade de diâmetro e comprimento, defeitos, aspecto da salmoura, aparência geral, odor, maciez, fibrosidade, gosto ácido, e sabor de palmito. Durante o armazenamento das conservas, Berbari *et al.* (2008) constataram que há perda de coloração verde nas variedades de palmeira Real Australiana, Açaí e Pupunha, indicando a provável oxidação de seus pigmentos e conseqüente escurecimento das mesmas. Ferreira *et al.* (1981; 1982) avaliaram o palmito de Pupunha em comparação com o palmito de Juçara, considerado de melhor qualidade e maior valor comercial. Ao contrário do palmito de Juçara, o palmito de Pupunha não apresentou atividade enzimática, tendo apresentado, após o processamento, cor amarelada e boa aceitação.

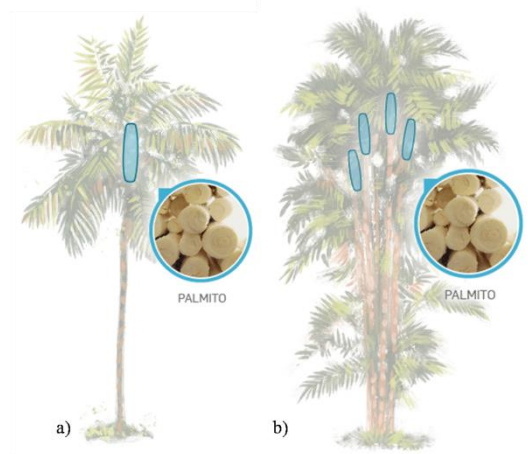
Os resultados das análises de textura de Berbari *et al.* (2008) mostraram que o palmito Pupunha apresenta maior maciez, seguido pelas palmeiras Real e Açaí. Estes resultados indicam que comparativamente, o palmito Pupunha apresenta tecido mais macio e, conseqüentemente, necessita de um tempo menor de cozimento. Em relação à cor, aparência, textura, sabor e preferência geral, o palmito da palmeira Real não apresentou diferença significativa dos palmitos das variedades de Pupunha e Açaí e se manteve sensorialmente estável durante o período de armazenamento. Estes resultados em conjunto com os resultados físico-químico, microbiológicos, de cor e textura objetiva indicam que uma vida de prateleira de 12 meses para o palmito da palmeira Real em conserva acidificada e pasteurizada é aceitável.

A identificação das espécies de palmitos em conserva tem uma clara importância já que as diferentes espécies têm diferentes valores comerciais, de acordo com as análises feitas por vários autores, como Berbari *et al.* (2008) e Ferreira *et al.* (1981; 1982). A crescente demanda por produtos naturais pode aumentar a sua substituição, adulteração intencional e inadvertida e também ocasionar a mistura de espécies, sendo esses os problemas comuns que afligem o comércio de alimentos dessas espécies (Seethapathy *et al.*, 2015). Alguns grupos de pesquisa têm buscado o desenvolvimento de métodos de identificação para promover às autoridades, indústrias e consumidores ferramentas úteis de controle, permitindo o reforço do regulamento de rotulagem e garantia de comércio legal dessas espécies e seus produtos (Chapela *et al.*, 2007; Nesvadbová *et al.*, 2010).

### 1.3 Caracterização do Problema

Atualmente, o Brasil é responsável por 95% da produção mundial de palmito, sendo também maior consumidor. Toda palmeira produz palmito, porém nem todo palmito é passível de consumo, havendo alguns que são, inclusive, venenosos. Ausência de princípios tóxicos, cor clara, sabor brando, maciez alta ou moderada, formato cilíndrico e diâmetro médio, são os principais atributos do palmito e que determinam que uma espécie seja preferida em relação à outra (Modolo, 2017). Na flora brasileira, são várias as espécies de palmeiras cujo palmito é apreciado. Atualmente o palmito Juçara é um dos produtos mais explorados na Mata Atlântica (Reis & Guerra, 1999). Essa exploração contribui para a degradação do meio ambiente e tornou-se um fator de preocupação para a preservação da espécie, uma vez que não há rebrota, pois apresenta um único estipe, não formando touceira o que torna incapaz de produzir perfilho acarretando na morte da planta após o corte para extração do palmito (Mortara & Valeriano, 2001) (Figura 3). Para que o palmito continue a existir e seja fonte renovável de riqueza, devem-se conhecer as orientações legais voltadas à preservação, extração e alternativas de industrialização para a espécie.

Sendo assim, a comercialização do palmito Juçara deve ter sua procedência confirmada ou proibida, conforme a legislação vigente específica para a espécie, e devidamente licenciada pela Agência Ambiental competente.



**Figura 3:** Extração de palmito da extremidade superior do estipe, ou seja, do meristma apical das palmeiras. Em palmeiras de estipe único (a), como *E. edulis* e *A. cunninghamiana*, não há rebrote após o corte. Em palmeiras com estipes múltiplos (b), como *E. oleracea* e *B. gasipaes*, é possível o manejo da planta após o corte, pois não acarreta a morte da mesma.

#### 1.4 Identificação de espécies

A discriminação, categorização e caracterização da diversidade biológica não são tarefas fáceis. Segundo Azevedo (2005), a identificação de espécies através de sua morfologia, para ser empregada como rotina, apresenta quatro limitações muito significativas: a plasticidade fenotípica e a variabilidade genética dos caracteres empregados para o reconhecimento de espécies; a omissão de *taxa* morfologicamente crípticos; as chaves morfológicas frequentemente são eficientes somente para um estágio do ciclo de vida. Assim, a limitação herdada no sistema de identificação baseada na morfologia e a escassez de taxonomistas especializados nos diferentes grupos de organismos sinalizam a necessidade de uma nova abordagem para identificação de táxons.

O desenvolvimento de técnicas moleculares, como PCR e sequenciamento de DNA, causou um grande impacto no campo da sistemática, desde o início da década de 1990 (Soltis & Soltis, 2000). O emprego da sistemática molecular vem crescendo cada vez mais, pois permite a identificação de novas linhagens e produz dados que podem ser especialmente pertinentes para o campo da biologia da conservação (Andreasen, 2005; Moritz, 1995; Soltis & Gitzendanner, 1999). Muitos estudos recentes mostram a importância da sistemática molecular na elucidação das relações taxonômicas de diversas espécies (Dick *et al.*, 2003; Karehed & Bremer, 2008; Martin-Bravo *et al.*, 2007; McNeill & Turland, 2009; Nagpal *et al.*, 2008; Peterson *et al.*, 2008; Soltis & Soltis, 2000).

## 1.5 Marcadores Moleculares – DNA barcode

Marcadores genéticos moleculares são ferramentas muito importantes em análises forenses, sendo usados com frequência em humanos na identificação de suspeitos em casos criminais (Hummel, 2003). Mais recentemente, as aplicações forenses de marcadores moleculares de material biológico não humano têm se desenvolvido e o número de tipos de marcadores e dados de referência estão aumentando tanto para espécies de animais, quanto de plantas (Finkeldey *et al.*, 2007). Uma importante aplicação de marcadores moleculares em ambiente forense é prover evidências de uso ilegal de material biológico, vivo ou morto. Na indústria alimentícia, por exemplo, os alimentos devem ser rotulados exatamente com as espécies que eles contêm, de acordo com normas específicas (Nesvadbová *et al.*, 2010). Na maioria dos casos forenses, a principal questão é identificar confiavelmente a origem do DNA de uma determinada amostra, o que pode ser realizado através da aplicação de técnicas moleculares de DNA *barcode*. Essa técnica consiste no isolamento de DNA de diferentes materiais biológicos, como pelos e penas de animais ou partes de plantas (Piggott & Taylor, 2003) e a utilização de regiões do DNA que sejam discriminatórias e características de uma determinada espécie (Herbert *et al.*, 2003a).

Uns dos principais problemas enfrentados na análise forense na indústria alimentícia são a quantidade e qualidade do DNA que é extraído das amostras. Quando uma planta passa pela indústria alimentícia e é processada, raramente é possível distingui-las por meio de análises anatômicas, mas, mesmo sendo difícil obter um DNA de qualidade, é viável a utilização de DNA *barcode*. Dois requisitos básicos precisam ser cumpridos para se usar a variação do DNA para a identificação de alimentos processados: (i) marcadores precisam ser desenvolvidos, já que são informativos no que diz respeito à identificação das espécies, e (ii) ser possível isolar o DNA em diferentes estados de processamento (Rachmayanti *et al.*, 2009).

### (i) DNA BARCODE

Para o desenvolvimento de um DNA *barcode* é necessário determinar o método mais apropriado e requer uma abordagem de fácil implementação, economicamente viável e reprodutível. Além disso, o método deve ser amplamente aplicável quando se trata de material vegetal desconhecido. Segundo Hebert *et al.* (2003a), o DNA *barcode* é interessante, pois: (i) preenche todos esses requisitos (Wong & Hanner, 2008), (ii) foi feita uma recomendação oficial para *barcode* em plantas (CBOL Plant Working Group, 2009), (iii) há grandes bancos de dados, como GenBank (Benson *et al.*, 2011) e BOLD (Ratnasingham & Hebert, 2007), os quais estão prontamente acessíveis, e (iv) DNA *barcode* pode ser usado com sucesso na distinção de várias espécies de plantas (CBOL Plant Working Group, 2009; Carrier *et al.*, 2013). Além

disso, o DNA *barcode* tem se mostrado extremamente útil quando o número amostral é limitado (Carrier *et al.*, 2013).

O termo "DNA barcoding" foi criado para descrever o uso de uma curta sequência genética de uma região padronizada do genoma como uma ferramenta para identificação de espécies (Hebert *et al.*, 2003a, b). Por muitos anos, os pesquisadores têm utilizado uma ampla gama de técnicas de marcadores de DNA, como microssatélites nucleares e plastidiais, DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), polimorfismos de tamanho de fragmentos amplificados (AFLP) e sequenciamento de DNA como ferramentas no estudo da dinâmica populacional (Soares *et al.*, 2018), delimitação de espécies (Goetze *et al.*, 2016), hibridação (Zanella *et al.*, 2016) e relações evolutivas (Goetze *et al.*, 2017). Apesar da grande utilidade de muitas dessas técnicas, uma grande desvantagem, especialmente quando usada para fins de identificação, é que elas não são padronizadas e, em muitos casos, não são padronizáveis em uma ampla gama de organismos diferentes ou para identificar os mesmos organismos em diferentes laboratórios (Cowan *et al.*, 2006).

O Consórcio para o Código de Barras da Vida (CBOL) foi formado em 2004. Seus objetivos são desenvolver "uma ferramenta precisa e confiável para a pesquisa científica sobre a taxonomia de espécies vegetais e animais, uma ferramenta prática e econômica para atribuir espécimes não identificados às suas espécies corretas e um sistema para expandir o interesse e a atividade na taxonomia" (ver <http://www.barcoding.si.edu/>). O CBOL prevê que esta ferramenta seja uma sequência genética curta de uma região universalmente amplificável. A principal aspiração desta iniciativa não é criar uma taxonomia molecular (DNA) como sugerida pelos defensores do *phylocode* (<http://www.ohiou.edu/phylocode/>) ou mesmo uma taxonomia de DNA na qual os dados da sequência de DNA seriam parte da tipificação de espécies (Tautz *et al.*, 2002, 2003), mas sim uma ferramenta para permitir a identificação rápida de organismos para um grupo mais amplo de usuários do que é possível no momento. Vários autores expressaram preocupações de que o DNA *barcode* possa ser visto como um substituto para a taxonomia (por exemplo, Ebach & Holdrege, 2005; Moritz & Cicero, 2004), enquanto outros apontaram que é uma ferramenta de identificação que, ao mesmo tempo, pode prover dados adicionais para uso por taxonomistas, destacando os taxa para os quais o esforço taxonômico adicional seria lucrativo (por exemplo, Gregory, 2005; Schindel & Miller, 2005).

Hebert *et al.* (2003a, b) propuseram o uso do gene mitocondrial, citocromo c oxidase subunidade 1 (*COI* ou *cox1*), como uma sequência adequada para *barcoding* de animais, e tem havido uma série de publicações desde então, ilustrando sua utilidade em uma série de táxons (por exemplo, Hebert *et al.*, 2004; Lorenz *et al.*, 2005). O *COI* é um gene fácil de ser amplificado em qualquer estágio de vida dos animais e,

por ser um gene mitocondrial, é vantajoso por possuir evolução rápida (ambiente oxidativo), ausência de introns, herança haplóide e exposição limitada para recombinação (Hebert *et al.*, 2004). Por várias razões, esta sequência genética não é adequada para uso como DNA *barcode* vegetal. Ainda é um objetivo da CBOL identificar as regiões de DNA plastidiais mais adequadas (uma ou talvez duas) para servir como um DNA *barcode* universal para todas as plantas terrestres. Recentemente, Kress *et al.* (2005) propuseram duas regiões de DNA (uma no genoma plastidial e outra no genoma nuclear) que têm o potencial de servir isoladamente ou em conjunto como um *barcode* para angiospermas.

Ao contrário dos animais, para os quais o DNA mitocondrial é altamente conservado em termos de conteúdo genético e ordem, mas com uma alta taxa de substituição de sequências (por exemplo, Brown *et al.*, 1979; Moritz *et al.*, 1987), os genomas mitocondriais de plantas superiores exibem rearranjos frequentes, transferência de genes para o genoma nuclear e incorporação de genes estranhos (por exemplo, Palmer *et al.*, 2000; Mower *et al.*, 2004). As taxas de substituição do genoma mitocondrial são muito mais lentas nas plantas do que é comum em animais e, com algumas exceções notáveis em táxons específicos (Bakker *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2004; Parkinson *et al.*, 2005), é o mais lento dos três genomas de plantas (mitocondrial, plastidial e nuclear). O sucesso de uma sequência de DNA como ferramenta de identificação de espécies depende da existência de substituições únicas que distinguem entre espécies intimamente relacionadas. Os genomas de plantas nucleares e plastidiais são, portanto, mais desejáveis para produzir uma sequência adequada para o DNA *barcoding*, isto é, aqueles que serão variáveis o suficiente para diferenciar entre espécies e, ao mesmo tempo, ter menos variabilidade intraespecífica que interespecífica (Chase *et al.*, 2005; Kress *et al.*, 2005). Também, o *barcode* ideal deve ser curto o suficiente para facilitar o sequenciamento (~700 pares de bases [pb] ou menos), tecnicamente simples de sequenciar (por exemplo, sem repetições longas que desafiam a precisão das polimerases de DNA), tamanho conservado para mitigar problemas de alinhamento e recuperável de amostras de herbário e outras amostras de DNA degradadas, tais como tecido conservado em álcool, madeira, frutas, etc. (Kress *et al.*, 2005). Além disso, um *barcode* efetivo usaria *primers* universais que podem ser aplicados em todos os grupos de plantas terrestres.

Kress *et al.* (2005) identificaram o espaçador *trnH-psbA* como um bom candidato a *barcode*. Este espaçador, embora curto (~450 pb), é excepcionalmente variável em muitos grupos de plantas (por exemplo, Shaw *et al.*, 2005) e é facilmente amplificado através de uma ampla gama de plantas terrestres. Foi demonstrado que a variabilidade dentro de espécie é inexistente ou excepcionalmente baixa (0,00-0,80% de divergência) (Tabela 1). A segunda região identificada por Kress *et al.* (2005) é o espaçador interno transcrito nuclear (*ITS*) do DNA ribossômico, que é comumente sequenciado em investigações filogenéticas de plantas em nível de espécie e apresenta altos níveis de divergência interespecífica. Já foi demonstrado que a variação intraespecífica é baixa em *ITS* (Baldwin *et al.*, 1995). O *ITS* poderia ser



potencialmente útil em um laboratório forense porque esse marcador pode ser amplificado em duas subunidades mais curtas (*ITS-1* e *ITS-2*) (Blattner, 1999). Juntas, essas duas regiões de DNA têm o potencial de discriminar maior número de espécies de plantas para fins de DNA *barcode*. Além disso, a extração de DNA e amplificação do espaçador *trnH-psbA* de espécimes herbários (alguns com mais de 100 anos) foi altamente bem sucedida (Kress *et al.*, 2005). Outros pesquisadores defenderam outras regiões, como *matK* (Kress & Erickson, 2008). Em 2009, o CBOL Plant Working Group propôs dois genes de cloroplastos, *rbcL* e *matK*, em conjunto, assumidos como um *barcode* para as plantas. Também, Dong *et al.* (2015) propuseram a região de cloroplasto *YCF1* como DNA *barcode* de plantas.

Algumas premissas devem ser analisadas para testar a eficiência do método de DNA *barcode* (Herbert *et al.*, 2004): o monofiletismo das espécies em questão deve ser confirmado e a divergência de nucleotídeos intraespecífica deve ser menor que a interespecífica. Quando as amostras de determinada espécie se agrupam de acordo com suas distâncias, elas formam um clado ou grupo monofilético, consistindo exclusivamente numa espécie ancestral e todos os seus descendentes. Quanto à segunda premissa, a análise é feita pelas distâncias genéticas das espécies, avaliando-se as distâncias intraespecíficas e interespecíficas, sendo desejável que os *barcode* mostrem divergência de sequência muito baixa dentro de uma espécie e com divergência de sequência significativamente maior em níveis taxonômicos mais altos. Assim, avalia-se o quanto essa distância é distinta, analisando se há diferença entre a maior distância intraespecífica e a menor distância interespecífica, estabelecendo-se um valor de corte para a delimitação de espécies. É o chamado “*barcode gap*”, uma vez que é esperado que se tenha um *gap* entre estas distâncias. Em todos os casos em que o método não foi eficiente, a segunda premissa não foi obedecida.

**Tabela 1:** Resultados de ensaios de Kress & Lopez (não publicado) e Kress *et al.* (2005) em 33 espécies de 26 famílias de plantas com flores e uma família de coníferas sobre a variação da sequência intraespecífica do espaçador *trnH-psbA* (Cowan *et al.*, 2006). Dois a cinco indivíduos foram amostrados para cada espécie. A variação inclui apenas substituições de ácido nucleico e não eventos indels (deleções e exclusões).

<b>Família</b>	<b>Número de espécies amostradas</b>	<b>Porcentagem de variação intraespecífica da sequência</b>
Alliaceae	1	0.00
Apiaceae	1	0.00
Apocynaceae	1	0.00
Asteraceae	2	0.00
Balsamiaceae	1	0.00
Betulaceae	2	0.00-0.66
Boraginaceae	1	0.00
Brassicaceae	2	0.00-0.28
Caprifoliaceae	2	0.00
Celastraceae	1	0.80
Crassulaceae	1	0.00
Cupressaceae	1	0.00
Ericaceae	1	0.00
Fabaceae	1	0.00
Juglandaceae	1	0.00
Lamiaceae	1	0.00
Lauraceae	1	0.25
Malvaceae	1	0.00
Oleaceae	1	0.00
Platanaceae	1	0.00
Polemoniaceae	1	0.25
Rubiaceae	1	0.00
Sapindaceae	3	0.00-0.26
Simaroubaceae	1	0.00
Solanaceae	1	0.00
Ulmaceae	1	0.00
Vitaceae	1	0.00

Embora estudos tenham fornecido evidências de que um DNA *barcode* de planta com alto grau de utilidade possa ser implementado, eles também ilustraram problemas que precisam ser superados para se obter o *barcode* ideal. O espaçador *trnH-psbA* usado em Kress *et al.* (2005) variou de 119 pb a 1.000 pb ou mais de comprimento entre os taxa de angiospermas estudados, e é provável que essa faixa aumentasse à medida que outros grupos de plantas terrestres fossem incluídos. Essa variação de comprimento, devido ao alto número de eventos de inserção e deleção conhecidos em *trnH-psbA* (Shaw *et al.*, 2005), pode levar a dificuldades no alinhamento, o que poderia ser problemático para seu uso como *barcode*. Embora o espaçador apresente uma variação interespecífica significativa na maioria dos grupos amostrados até o momento, ele ainda pode falhar em discriminar as espécies nos táxons de plantas terrestres com diferenciação genética notoriamente baixa entre as espécies, como palmeiras e orquídeas. O rastreamento apenas de regiões plastidiais supera os problemas de múltiplas cópias variáveis conforme encontradas em *ITS*, e as dificuldades técnicas de sequenciar regiões nucleares de cópia única, especialmente quando se utiliza DNA de baixa qualidade ou degradado. Novos algoritmos para combinar sequências de *barcode* para produzir identificadores únicos no nível das espécies terão que ser desenvolvidos para lidar com esses problemas de variação do comprimento do espaçador e a necessidade de combinar mais de uma região de DNA para obtenção de um DNA *barcode* efetivo da planta (Cowan *et al.*, 2006).

Dada a crescente facilidade e rapidez do sequenciamento do DNA, juntamente com a redução dos custos, o DNA *barcode* facilitará pesquisas de biodiversidade de forma rápida e em grande escala, tanto para fins de inventário quanto para estudos ecológicos. Estes poderiam ser realizados sem pré-seleção de amostras ou sem a necessidade de taxonomistas dedicarem seu tempo à identificação altamente repetitiva. Isso permitiria a identificação de diferentes fases da vida, por exemplo, sementes ou plântulas, e fragmentos de material vegetal que não possuem os caracteres morfológicos necessários para identificação. Há uma crescente demanda por identificação de plantas nos campos de comércio internacional (regulamentos CITES), forense, fitoterápicos e alimentos comerciais (Cowan *et al.*, 2006).

Entretanto, para poder implementar esses usos potenciais e torná-los amplamente disponíveis, um banco de dados de referência de *barcode* de plantas deve ser construído usando amostras totalmente verificadas e aprovadas, com múltiplas amostragens por espécie para avaliar a variabilidade dentro das espécies. Portanto, é desejável que o DNA *barcode* seja recuperável de espécimes de herbário já existentes. Este nível de amostragem também é esperado para espécies crípticas de alto potencial elucidativo e fornece dados para estudos de delimitação de espécies (Hebert *et al.*, 2004). Uma vez totalmente desenvolvido, o DNA *barcode* tem o potencial de mudar completamente não apenas como os pesquisadores entendem e monitoram a biodiversidade, mas também, como enfatiza Janzen (2005), a relação do público em geral com

a natureza. Se implementado com sucesso, o *barcode* fornecerá uma nova ferramenta vital para apreciar e gerenciar a imensa e mutável biodiversidade da Terra.

## (ii) EXTRAÇÃO DE DNA

A qualidade de DNA obtido a partir de amostras para o uso de DNA *barcode* pode ser considerada um desafio, principalmente quando se trata de alimentos processados, como por exemplo, o palmito em conserva. Já é comprovado que o DNA sofre degradação devido ao tratamento térmico no qual a planta é submetida durante o processo de conserva, mas também o tipo de líquido presente pode ter um importante papel na sua degradação (Bauer *et al.*, 2003).

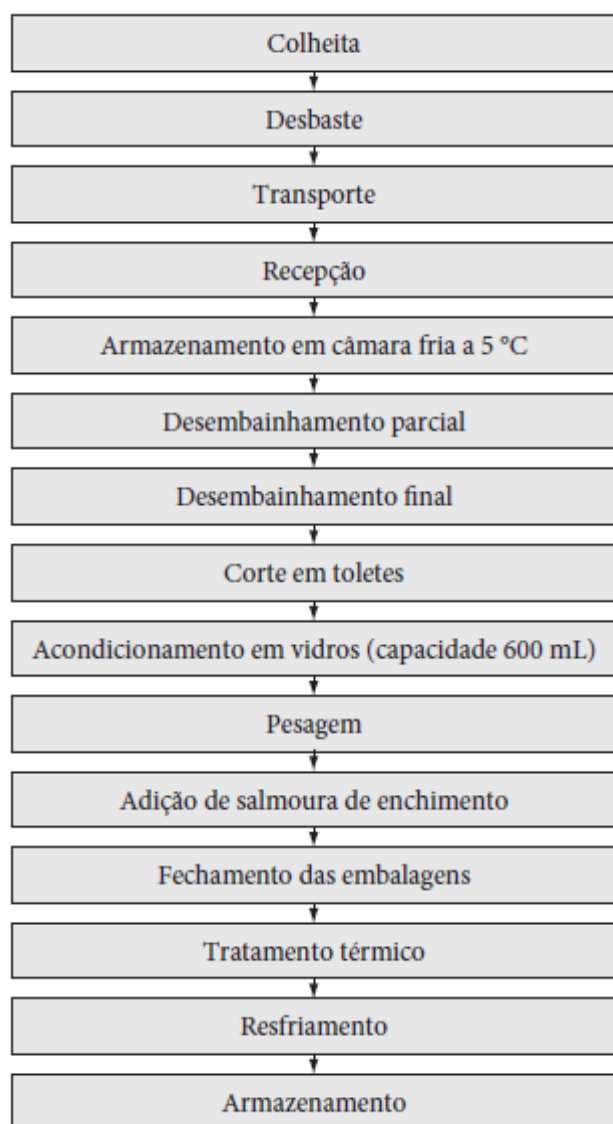
Os principais obstáculos para a extração de DNA de alimentos processados, quando comparados aos tecidos *in natura* das plantas são:

- (i) **Processamento.** O processamento de conservas acidificadas e pasteurizadas pode ser realizado conforme descrito no fluxograma mostrado pela Figura 4 (Berbari *et al.*, 2008). A imersão em solução de espera é preparada tal qual a salmoura de enchimento utilizada no acondicionamento da conserva. A salmoura acidificada com ácido cítrico tem importância do ponto de vista de segurança alimentar do produto, conforme a Resolução – RDC N° 17 de 19/11/99 – ANVISA/MS da Legislação Brasileira, pois a correta acidificação para pH menor ou igual a 4,5 é a garantia de que na conserva não irão se desenvolver os esporos do *Clostridium botulinum*. O DNA é bastante sensível a agentes ácidos e alcalinos devido ao mecanismo da degradação hidrolítica do DNA (Peano *et al.*, 2004). Baixo pH, portanto, tem sido descrito como um agente que favorece o aumento da degradação do DNA (Bauer *et al.*, 2003). O superaquecimento pode causar degradação irreversível do DNA, portanto, deve ser evitado (Rachmayanti *et al.*, 2009). Entretanto, para o processo de pasteurização é necessário um tratamento térmico, geralmente em água em ebulição durante um tempo considerável, fazendo com que as proteínas sejam desnaturadas e o DNA seja fragmentado e danificado (Peano *et al.*, 2004). Mesmo assim, o DNA que sofreu desnaturação térmica ainda pode ser detectado pela amplificação de pequenos fragmentos (Nesvadbová *et al.*, 2010).
- (ii) **Compostos químicos.** Numerosos agentes e componentes de conservas potencialmente inibem a extração de DNA ou resultam em baixa qualidade do DNA não apropriado para amplificação por PCR, uma vez que tratamentos químicos e físicos causam quebras aleatórias na dupla-fita, reduzindo o tamanho dos fragmentos de DNA (Peano *et al.*, 2004; Rachmayanti *et al.*, 2009).

- (iii) Biológico. Decomposição do material por fungos e microrganismos resulta em degradação e fornece uma fonte alternativa de DNA (Rachmayanti *et al.*, 2009). A contaminação com DNA de outros organismos torna-se grave em casos onde o líquido da conserva não esteja em pH correto ou após o produto ser aberto e entrar em contato com o ar e é particularmente prejudicial para a aplicação de marcadores genéticos. Além disso, amostras mais frequentemente manipuladas e grandes volumes de reagentes provavelmente aumentam o risco de contaminação (Caputo *et al.*, 2013).
- (iv) Idade. Degeneração do DNA irá começar após a morte da célula vegetal (Rachmayanti *et al.*, 2009). Espera-se que o tamanho dos fragmentos que podem ser amplificados e investigados diminua continuamente após o corte do produto e após longos períodos de armazenamento em conserva.

Além da degradação do DNA ou a falha no seu processo de extração, os inibidores de PCR também podem ser um grande problema nas análises baseadas em DNA. Substâncias que atuam como inibidores podem estar presentes em todas as frações de DNA extraído, assim, a concentração dos inibidores pode aumentar em amostras contendo grandes quantidades de material inicial, reduzindo o número de *loci* amplificados (Caputo *et al.*, 2013). Caputo *et al.* (2013) sugerem a incorporação de um passo final adicional de fervura para a desnaturação de inibidores e para amplificações mais eficientes. Além disso, a qualidade do DNA ainda pode ser melhorada quando se extrai DNA de pequenos pedaços do material ao invés de pó. Teoricamente, o pó pode produzir uma maior quantidade de DNA, porque se tem maior superfície de contato entre os fragmentos e a solução de extração, mas o DNA também se encontra mais exposto a agentes degradantes, aumentando os efeitos estocásticos durante a amplificação de PCR (Alaeddini *et al.*, 2010).

O objetivo de um procedimento de extração é obter alta quantidade e qualidade de DNA de uma amostra a ser analisada quanto a sua identificação. Portanto, deve conter o mínimo possível de proteínas, RNA ou outros inibidores de PCR, também evitando a fragmentação durante a extração. O tempo necessário para a completa extração, os custos e a toxicidade dos produtos químicos empregados são importantes fatores a serem levados em conta na escolha do método de extração (Chapela *et al.*, 2007). Além disso, quanto à quantidade de DNA em uma amostra, isso pode depender de diferentes fatores, como a quantidade de amostra inicial, tempo de eluição, temperatura do tampão de eluição, volume final da extração, número de eluições e outros (Nesvadbová *et al.*, 2010).



**Figura 4:** Etapas básicas do processamento de palmito em conserva (Berbari *et al.*, 2008).

## 1.6 Objetivos

O objetivo geral desse estudo foi identificar marcadores moleculares de DNA (DNA *barcodes*) que possuem poder discriminatório entre as espécies de palmeiras comercializadas como palmito. Os objetivos específicos foram: (i) desenvolver um protocolo eficiente para extração de DNA de palmito fresco e processado de Juçara, Palmito Real, Açaí e Pupunha; (ii) identificar regiões de DNA que podem servir como DNA barcode, discriminando cada espécie; e (iii) testar o método desenvolvido e padronizado em amostras de diferentes espécies de palmito, a fim de testar sua eficácia. Os resultados gerados fornecerão um teste eficiente, ambos usando DNA *in natura* e em conserva, para discriminação de espécies. Como existe uma diferença na legislação que permite a comercialização das espécies de palmito, a proposta de um mecanismo eficiente para a identificação das espécies utilizando apenas uma pequena quantidade de

amostra biológica, ou mesmo o produto processado, é extremamente útil para uso em estudos forenses e para a conservação de espécies nativas.



2. **ARTIGO:** Use of DNA barcode to identify species of palm heart as a tool for forensic genetics

Cristina Corrêa Todeschini, Laís Mara Santana Costa, José Henrique Souza Galdino Brandão, Camila Aguiar de Melo and Fernanda Bered

Artigo sera submetido à Forensic Science International: Genetics.



## ABSTRACT

Heart-of-palm can be harvested from different species of palms. It is basically composed of the unexpanded leaves immediately above the apical meristem, responsible for the development of the palm tree. Currently, Brazil is accountable for 95% of the world production of palm heart, and is also a major consumer. Most of the heart-of-palm production comes from palms of the *Euterpe* genus. Due to wide natural distribution and high population density, the species *Euterpe edulis* and *Euterpe oleracea* have been exploited for this purpose in a predatory level. This exploitation contributes to the degradation of the environment and has become a concern factor for the preservation of *E. edulis*, since there is no regrowth, as it presents a single stem. Here we report an initiative to enforce a regulatory program based on DNA Barcode identification of mislabeled palm heart products commercialized in Southern Brazil market places. In this study, we attempted to distinguish four species used as palm heart (*E. edulis*, *E. oleraceae*, *Bactris gasipaes* and *Archontophoenix cunninghamiana*) both in natura and processed palm heart. Our method includes three chloroplast markers, candidates as DNA barcode markers: *rps16-trnK*, *trnL-trnF* and *rpl32-trnL*, and the nuclear marker: *ITS2*, to compare the four species according to amplification success, discrimination power and inter- and intra-specific divergence. Our results showed that *rpl32-trnL* can be used individually as a barcode as well as concatenated markers to distinguish plant species, while for animals only the *COI* (cytochrome oxidase I) is needed. Concerning *ITS2* marker, it could be amplified for all the processed species of this study, but sequenced only for *E. edulis*, *E. oleraceae* and *Bactris gasipaes*. For the *trnL-trnF* marker, only the processed samples *E. oleraceae* could be successfully amplified and sequenced, and only for this marker the NJ tree-based method could be performed with success. The implementation of such regulatory programs using innovative technologies, such as DNA based identification methods, may discourage deliberate replacement in the palm heart market and lead to a significant reduction in palm heart mislabeling.

## INTRODUCTION

DNA barcoding involves sequencing short DNA sequences from a particular region of the genome and comparing them between and within species to present a “barcode” for species identification. Besides species identification, DNA barcodes have also been deemed to improve or supplement traditional taxonomy based on morphological characters (Hebert *et al.*, 2003b). An ideal barcode must conform to at least three criteria: (1) universality (ease of amplification and sequencing), (2) sequence quality, and (3) discriminatory power (Hollingsworth *et al.*, 2011). This technique proved to be a promising tool for species discrimination in animals using the mitochondrial gene cytochrome c oxidase I (*COI*) (Cowan *et al.*, 2006). In plants, this is not a straight forward technique because of the lower evolutionary rate of plant mitochondria, resulting in less variation in the *COI* gene among species (Hollingsworth *et al.*, 2011). In some plants, the chloroplast genome showed potential for candidate barcoding genes with features such as conserved gene order, high copy number, and easy amplification by polymerase chain reaction (PCR) (Chase *et al.*, 2005). A multi-locus approach using the chloroplast genome has been successfully used as an effective strategy to barcode various land plants (Kress & Erickson, 2007; Newmaster *et al.*, 2008; CBOL Plant Working Group, 2009; Cowan *et al.*, 2006). Recently, standard barcodes for plants have been tested for this purpose (Chase *et al.*, 2005; Cowan *et al.*, 2006; Kress & Erickson, 2007; Lahaye *et al.*, 2008; CBOL Plant Working Group, 2009). These barcoding efforts resulted in in silico libraries of DNA barcode sequences that could be used as a standard for species identification such as the Barcodes of Life Data system (BOLD; Ratnasingham & Hebert, 2007).

Palmae (Arecaceae) is the third most important plant family for human use, due to the wide variety of products in the form of food, oils, wood and landscaping; it includes about 252 genera and 3500 species distributed across the tropics and subtropics (Dransfield *et al.*, 2008; Lorenzi *et al.*, 2010). Palm heart, a product considered as unconventional vegetable, can be obtained from a large number of palm species. Botanically, it consists of the apical bud, responsible for the development of the palm tree, surrounded by leaves not yet developed and positioned at the upper end of the palm stipe (Tabora Jr. *et al.*, 1993). Currently, Brazil is accountable for 95% of the world palm heart production, and is also a major consumer. Every palm tree produces palm hearts, but not all palm hearts can be consumed, some of which are even poisonous. In the Brazilian flora, there are several species of palm trees whose palm heart is appreciated, especially the açai (*Euterpe oleracea*), the juçara (*Euterpe edulis*) and the pupunha (*Bactris gasipaes*). Currently, the palm heart Juçara is one of the most exploited products in the Atlantic Forest (Reis & Guerra, 1999). This exploitation contributes to the degradation of the environment and has become a concern factor for the preservation of the species, since there is no regrowth, because it presents a single stipe, not forming a clump which renders it incapable of producing tillering causing in the death of the

plant after cutting for palm heart extraction (Mortara & Valeriano, 2001). Recently, the Australian palm tree of the genus *Archontophoenix* have emerged as an option for the production of quality heart of palm, replacing predatory exploitation of native species, mainly *Euterpe edulis*. In the South and Southeast of Brazil the species *Archontophoenix cunninghamiana* (Royal palm) has been used as an alternative source of palm heart (Ruiz Filho *et al.*, 2010).

Determining the genetic variation in palm cultivars using morphological traits is difficult because the required phenotypic data are often difficult to assess due to high environmental effects. Moreover, morphological discrimination identifies individuals at a specific life stage or gender in such a way that many individuals remain unidentified or are wrongly identified (Sedra *et al.*, 1993). Under these conditions, a molecular approach seems particularly useful. Therefore, this study assessed the potential and efficacy of barcoding using three chloroplast (*rps16-trnK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF*) and a nuclear loci (*ITS2*) as barcodes of Palmae for species discrimination. The general objective was to identify molecular markers of DNA (DNA barcodes) that have discriminatory power among palm species marketed as palm heart. The specific objectives were: (i) to develop an efficient protocol for extracting DNA from fresh and processed Juçara, Palmito Real, Açaí and Pupunha palms; (ii) to identify regions of DNA that can serve as DNA barcodes, discriminating each species; and (iii) to test the method developed and standardized on samples of different species of palm heart, in order to test its effectiveness. The results generated will provide an efficient test, both using in natura and canned DNA, for species discrimination. Since there is a difference in the legislation that allows the commercialization of the species of palm heart, the proposal of an efficient mechanism for the identification of the species using only a small amount of biological sample, or even the processed product, is extremely interesting for use in forensic studies and for the conservation of native species.

## MATERIAL AND METHODS

### DNA EXTRACTION AND PCR AMPLIFICATION

Leaf, stem and processed samples of four species, from two populations for the species of *E. edulis* and *A. cunninghamiana*, and one population for *E. oleracea* and *B. gasipaes*, of the Arecaceae family were collected for DNA extraction (Table 1). DNA was isolated from in natura collected samples by a CTAB method (Doyle & Doyle, 1990) with modifications. The DNA from the processed samples of Juçara, Açaí, Royal palm and Pupunha was extracted by two isolation methods, with modifications. Basically, the samples were homogenized using a mixer mill and DNA was isolated following standard and small fragment protocol of DNeasymericon food kit (QIAGEN) and CTAB method (Doyle & Doyle, 1990) with modifications. After the DNA isolation, the quality and quantity of DNA were verified performing the

methods of agarose gel electrophoresis and the measuring absorbance by spectrophotometer. A dilution of 10 ng/μl of DNA concentration was used for PCR amplification. After the screening for candidate barcodes loci for the studied species, the chloroplast markers (*rps16-trnK*, *rpl32-trnL* and *trnL-trnF*) and nuclear marker (*ITS2*) were selected and amplified using the primers described in the literature (Table 2). The amplifications were performed in 20 μl reactions. PCR conditions were as follows: for *rps16-trnK*, initial denaturation at 94°C for 3 min, 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 62°C and 1 min at 72°C, and a final extension of 10 min at 72°C; for *rpl32-trnL*, initial denaturation at 95°C for 5 min, 35 cycles of 30 s at 95°C, 1 min at 50°C (*A. cunninghamiana*), 52°C (*B. gasipaes*), 56°C (*E. edulis* and *E. oleraceae*) and 1 min 30 s at 72°C, and a final extension of 7 min at 72°C; for *trnL-trnF*, initial denaturation at 94°C for 5 min, 40 cycles of 50 s at 94°C, 50 s at 48°C and 50 s at 72°C, and a final extension of 10 min at 72°C; and for *ITS2*, initial denaturation at 94°C for 5 min, 35 cycles of 40 s at 94°C, 45 s at 50°C and 50 s at 72°C, and a final extension of 8 min at 72°C. The PCR amplifications success were checked in a 2% agarose gel and compared to a 100bp Ladder (Ludwig). To further evaluate the candidate barcodes, we searched in GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) for all the sequences deposited for Arecaceae for each of the four markers examined, totaling 247 species (Table 3).

## SEQUENCING

Samples were sequenced using forward and reverse primers of the markers, which were also used for PCR amplifications. The sequencing was carried out by Macrogen, Korea. Primer sequences were confirmed in the raw sequencing data, and all sequences were submitted to BOLD under the sequence submission tool (<http://www.boldsystems.org>) in the project “ARECA - Use of barcode DNA for identification of Arecaceae species in forense genetic”.

## DATA ANALYSIS

The sequencing data acquired for all Palmae species for the four markers (*rps16-trnK*, *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* and *ITS2*) were aligned separately and concatenated in two, three and four partitions using the algorithm MUSCLE. Also, a tree of Neighbour-Joining, using genetic distances, was made in MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). The transition and transversion rates and the nucleotide frequencies for each marker were calculated also in MEGA7. The interspecific and intraspecific divergence of each barcoding region was calculated by Kimura-2-parameter distances in the BOLD analysis tool called Distance Summary (Ratnasingham & Hebert, 2007). Also, the Barcode Gap analysis (Ratnasingham & Hebert, 2007) was made in BOLD, which analyzes the difference between the greater intraspecific distance and the smaller interspecific distance.

## RESULTS

### AMPLIFICATION AND SEQUENCING

The average of amplified PCR products from in natura samples using *rps16-trnK*, *trnL-trnF*, *rpl32-trnL* and *ITS2* markers were 735, 392, 568 and 311bp, respectively (Table 3). The amplification success rate for these samples, was 100% for all markers and the sequencing success rate was 78.6% for *rps16-trnK*, 92.9% for *trnL-trnF*, 57.1% for *rpl32-trnL* and 35.7% for *ITS2* (Table 4). The sequence alignment showed nucleotide polymorphisms among species. These polymorphisms were further evaluated to estimate the interspecific and intraspecific divergence.

The transversion and transition rates calculated for each of the four markers evaluated, considering the samples collected in the study and from GenBank, were presented in Tables 5, 6, 7 and 8. For the *rps16-trnK* marker, the analysis involved 61 nucleotide sequences. There were a total of 949 positions in the final dataset. The nucleotide frequencies estimated were A = 28.95%, T/U = 39.56%, C = 15.22%, and G = 16.28% (Table 5). For the *trnL-trnF* marker, the analysis involved 123 nucleotide sequences. There were a total of 440 positions in the final dataset. The nucleotide frequencies obtained were A = 31.25%, T/U = 36.83%, C = 19.20%, and G = 12.71% (Table 6). For the *rpl32-trnL* marker, the analysis involved 55 nucleotide sequences. There were a total of 860 positions in the final dataset and the nucleotide frequencies were A = 35.89%, T/U = 37.73%, C = 12.30%, and G = 14.08% (Table 7). Finally, for the *ITS2* marker, the analysis involved 176 nucleotide sequences. There were a total of 463 positions in the final dataset and the nucleotide frequencies were A = 14.20%, T/U = 12.74%, C = 37.82%, and G = 35.08% (Table 8).

### GENETIC DIVERGENCE ANALYSIS

The aligned sequence lengths for the samples in natura varied from 360 bp for *ITS2* to 2119 bp for *rps16-trnK + trnL-trnF + rpl32-trnL + ITS2*. Including the Genbank species, the aligned sequence lengths varied from 440 bp for *trnL-trnF* to 1937 bp for *rps16-trnK + trnL-trnF + rpl32-trnL* (Table 9).

The mean interspecific distances of the examined loci in the present study were, in average, greater than the intraspecific distance (Table 9). The exception was the *ITS2* marker, where the intraspecific distance could not be calculated because only one species, *Archontophoenix cunninghamiana*, collected in the study was amplified successfully. This can be observed also when *ITS2* is concatenated with the other markers, probably due to the lack of data for this marker.

## MONOPHYLY TEST BASED ON PHYLOGENETIC TREES

The discriminatory success of single and combined barcodes was determined by evaluating the percentage of each species determined to be monophyletic using NJ trees. For this analysis, it was considered only the species with two or more individuals. For the tree-based method of *rps16-trnK*, *rpl32-trnL* and *rps16-trnK* + *rpl32-trnL* markers, it was included the species: *Acrocomia aculeata*, *Arenga caudata*, *Cocos nucifera* and *Phoenix dactylifera* from Genbank, together with the species from this study: *A. cunninghamiana*, *B. gasipaes*, *E. edulis* and *E. oleraceae*. Beyond the species collected in this study, for the *trnL-trnF* marker, it was included the species: *A. aculeata*, *Areca tiandra*, *Brahea brandegeei*, *C. nucifera*, *Elaeis guineensis*, *Kentiopsis magnifica*, *K. oliviformis*, *Linospadix monstachya*, *Serenoa repens*, *Trachycarpus fortunei* and *Veitchia arecina*. For the *ITS2* marker, it was included the species: *A. aculeata*, *Areca vestiaria*, *Calamus tenuis*, *C. viminalis*, *Carpentaria acuminata*, *E. guineensis*, *Nenga pumila* var. *pachystachya*, *Pinanga arinasae*, *P. batanensis*, *P. brevipes*, *P. chaiana*, *P. curranii*, *P. egregia*, *P. heterophylla*, *P. insignis*, *P. javana*, *P. malaiana*, *P. mirabilis*, *P. philippinensis*, *P. rumphiana*, *P. urosperma* and *Ptychosperma burretianum*. For the *rps16-trnK* + *trnL-trnF*, *trnL-trnF* + *rpl32-trnL* and *rps16-trnK* + *trnL-trnF* + *rpl32-trnL* markers, it was included the species: *A. aculeata* and *C. nucifera*. Based on the monophyletic species value of the NJ tree, the rank order of monophyletic species and varieties identification power of the candidate barcode, considering the bootstrap value and including the collected samples and the Genbank samples was: *rps16-trnK* + *trnL-trnF* + *rpl32-trnL* (100%) (Figure 1) > *rps16-trnK* + *rpl32-trnL* (100%) (Figure 2) > *trnL-trnF* + *rpl32-trnL* (100%) (Figure 3) > *rpl32-trnL* (100%) (Figure 4) > *rps16-trnK* (87.5%) > *rps16-trnK* + *trnL-trnF* (83.3%) > *ITS2* (70.8%) > *trnL-trnF* (60%) (Table 10). With exception of *ITS2* and *trnL-trnF* markers, all the other candidate barcode showed similarity between *Acrocomia aculeata* and *Bactris gasipaes*, because they were in the same node. Regarding to the candidate barcodes with 100% of discrimination power of the species, only for the marker *rpl32-trnL* the genus *Euterpe* could not form a clade, thus indicating that this marker could not distinguish very well genus. For *rps16-trnK* and *rps16-trnK* + *trnL-trnF* barcodes, *E. oleracea* did not form a clade. For *ITS2* barcode, *A. cunninghamiana* did not form a clade. And for *trnL-trnF* barcode, *A. cunninghamiana* and *E. oleracea* did not form clades.

## BARCODING GAP TEST

The barcoding gap between intra- and interspecific distances was determined using the “barcoding gap analysis” tool in BOLD, for the candidate sequences. The barcode gap calculates the difference between the greatest intraspecific distance and the smallest interspecific distance, ie, the nearest neighbor distance. The distance to the nearest neighbor, considering only the species collected in the study, can be

observed in Table 11, and, considering the species collected in the study together to those from Genbank with more than one individual per species, for isolated markers, the results are presented in Table 12.

## PROCESSED PALM HEART

All the results about methods applied in processed samples are summarized in Table 13. We were able to isolate DNA from the four processed species. With QIAGEN method, we obtained PCR amplification success in the four species used as palm heart. On the other hand, with the CTAB method, we only had amplification success with Açai. Sequencing success was obtained for Açai, using DNA from both extraction methods, for the *trnL-trnF* marker. We were also able to sequence DNA from *B. gasipaes*, *E. edulis* and *E. oleraceae* using DNA isolated with QIAGEN method, and from *E. oleracea* using also DNA isolated with CTAB method for the *ITS2* marker. We performed a tree-based method analysis using the *trnL-trnF* data, because only for this marker there were other individuals from the same species to test the monophyly of the species. As expected, the samples of açai from individuals in natura clustered with those from processed açai samples, evidencing that the information on the processed product label was correct (Figure 5).

## DISCUSSION

DNA barcoding is a valuable tool for taxonomists working with Palmae and also for forensic cases. It can be used to identify species efficiently and accurately in the basis of a standard region as a marker. However, the identification of an ideal region in plants, which must be sufficiently variable to differentiate all the species and conserved enough to be minimally variable within species, can be considered a challenge (Kress *et al.*, 2005). Various loci have been tested and evaluated as DNA barcode in plants, and different studies have tried to define a standard barcode. CBOL has proposed *rbcL* and *matK* as standard barcodes for land plants (CBOL Plant Working Group, 2009). However, in the present study those markers could not be amplified, so *rps16-trnK*, *trnL-trnF*, *rpl32-trnL* and *ITS2* were used as candidate regions.

To evaluate a DNA barcode, universal PCR amplification and sequencing success are important parameters. In this study, the four barcode regions showed 100% amplification success. However, only three barcode regions showed more than 50% sequencing success (*rps16-trnK*, *trnL-trnF* and *rpl32-trnL*). *ITS* was proposed as a complementary marker to the core barcodes (CBOL Plant Working Group, 2009), since many studies have demonstrated high variability in this locus (Kress *et al.*, 2005, Seethapathy *et al.*, 2014). In our study, *ITS* had poor success rates of sequencing considering in natura samples, which may indicate a problem in PCR amplification or sequencing process. Yang *et al.* (2012) also had poor success rates of sequencing with *ITS*, however, they used the *ITS4/ITS5* primer set which is initially designed for

fungi. Another probable reason is that the *ITS* region of the species examined by Yang *et al.* (2012) may have multiple divergent copies that can lead to misidentification in DNA barcoding due to differential sampling of divergent paralogues (Jeanson *et al.*, 2011). On the other hand, *ITS2* exhibited the highest species discrimination (92%) in 40 species from the tribe Caryoteae (subfamily Coryphoideae) (Jeanson *et al.*, 2011). Unexpectedly, *ITS2* amplified in our processed samples and did not amplify in the fresh samples. Therefore, new tests should be done to explain this result.

Three markers of the study (*rps16-trnK*, *trnL-trnF* and *ITS2*), individually exhibited intermediate species discrimination rates. Based on the NJ tree, the success rate for *rps16-trnK*, *trnL-trnF* and *ITS2* was 87.5%, 60% and 70.8%, respectively. The exception was *rpl32-trnK*, which showed 100% sequencing success rate, even higher than the combination *rps16-trnK* + *trnL-trnF* (83.3%). When combining the markers, the success rate increases for 100%, with exception of *rps16-trnK* + *trnL-trnF*. Some candidate barcodes showed great genera discriminatory: *rps16-trnK* and *rps16-trnK* + *trnL-trnF* showed 100% success rate, *ITS2* showed 89% and *trnL-trnF* showed 61.5%. Although the *trnL-trnF* marker had been proposed as an efficient barcode (Hollingsworth *et al.*, 2011), in this study, it showed the lowest discriminatory power, probably due to the conserved state of this marker in the evaluated species and low variability between them.

Our results are in agreement with the fact that a favorable barcode must possess more interspecific divergence than intraspecific divergence to distinguish the species (Table 10) (Hollingsworth *et al.*, 2011). Based on barcode gap analysis, which compared the intra- and interspecific distances, the *trnL-trnF* marker showed the lower, but existents, distances to the nearest neighbor and had 50% of comparisons of species failed (mean intraspecific distance was equal or greatest than de distance to the nearest neighbor), emphasizing the low discriminatory power of this marker in this study. The greatest distances to the nearest neighbor was observed in *ITS2* marker and had 47.8% of comparisons of species failed. The second greatest to the nearest neighbor was observed in *rpl32-trnL* with no comparisons of species failed, emphasizing the efficient used of this marker as barcode, followed by *trnL-trnF* + *rpl32-trnL* and *rps16-trnK* + *rpl32-trnL*.

The aim of extraction procedures was to obtain high quality and quantity of DNA suitable for the species identification, mainly when considering the processed samples. The DNA extraction methods have impact in quantity and quality of the extracted DNA and on the efficiency of the DNA amplification (Nesvadbová *et al.*, 2010). Exposure to heat and physical or chemical treatments are known to cause fragmentation of DNA molecules and random breaks in DNA strands (Peano *et al.*, 2004). The extraction method, the type of liquid employed for canning, cooking and other processing agents lead to DNA



degradation and have a great influence on DNA quality, quantity and results in PCR analyses (Chapela *et al.*, 2007). DNA quality is a critical factor for most amplification-based analyses, because the amplification of DNA is influenced by the presence of inhibitors from the matrix or the extraction reagents, which can reduce the efficiency of the PCR reactions (Alaeddini *et al.*, 2010). Nevertheless, DNA which underwent thermal denaturation can be still detected by short fragment amplification (Nesvadbová *et al.*, 2010). So, the correct choice of the DNA extraction method and DNA quantification are very important steps in the analytical procedure to ensure optimal results (Nesvadbová *et al.*, 2010) and also depends on different factors such as input amount of samples, elution time, temperature of elution buffer, final elution volume, number of elutions, etc. As for Nesvadbová *et al.* (2010), the DNA isolated from palm heart was substantially damaged. Even so, Nesvadbová *et al.* (2010) performed successful PCR analysis.

The commercial kit from QIAGEN employ as separation principles lysis with proteinase K, chaotropic salts and denaturants binding of DNA to a silica membrane, while the CTAB method employ CTAB as a cationic detergent which binds DNA and favours the extraction of DNA-CTAB complex from proteins in lipid-phase extraction (chloroform-water), also using proteinase K for lysis (Chapela *et al.*, 2007). The optimized chemistry of the DNeasy mericon Food Kit was developed to recover short DNA fragments (down to 100 bp) ensuring that even highly fragmented DNA is efficiently isolated and subsequently amplified in PCR reactions, explaining why with this protocols the DNA of palm heart from Juçara, Açaí, Pupunha and Royal could be easily isolated (Table 13). Probably, the reason why the CTAB method could not amplify successfully all the four target species of this study is because each species need a different and specific modifications in the protocols, once they have different properties (Berbari *et al.*, 2008). Another fact influencing the success amplification and sequencing is the size of the marker. The DNA isolated from canned palm heart is highly fragmented, presenting small regions that can be analysed. *TrnL-trnF* (392 bp) and *ITS2* (311 bp) markers are the smallest markers used in this study and were the only ones that presented success amplification and sequencing (Table 13).

In conclusion, of the regions examined in this tudy, the *rpl32-trnL* region is an appropriate single barcode for the species analyzed. Besides that, a barcoding system based on *rps16-trnK*, *trnL-trnF* and *rpl32-trnL* has the potencial to differentiate most of the species examined. We consider DNA barcoding to be a useful tool to identify species within these economically and ecologically important genus. Our results showed that mainly *E. oleracea* can be well discriminated using *trnL-trnF* marker. For accurate species identification, further studies on the species from other geographic regions and more candidate barcodes are required.

One of the premisses of DNA barcode is the analysis of populations from different geographic sites. Although the number of samples seems small, other studies regarding DNA barcoding also had small samples, as Seethapathy *et al.* (2014) with 2 to 4 individuals per species, Yang *et al.* (2012) with 2 to 5 and Naeem *et al.* (2014) with 1 individual per species. Thus, our sample size being in agreement with those from other published studies. However, according to Zhang *et al.* (2010), the samples sizes used routinely in the database of DNA barcoding studies (2-10) are far from discovering most of genetic diversity of a population or species, hence this will bias the species identification potentially. They propose a simple resampling approach to estimate several key sampling sizes for a DNA barcoding project, which sample size may be around of 10-90.

Other studies regarding the use of DNA barcode as a tool for forensic discrimination in plants have been made. Mello *et al.* (2015) used a segment of *rbcL* gene to discriminate *Cannabis sativa* seized at Rio de Janeiro, Brazil. Median-Joining Network analysis was made in order to visualize the sequences in clusters, and to determine the efficiency of the *rbcL* gene discrimination. *C. sativa* is well separated from all other groups of the Cannabaceae family, including the closely related *Humulus*, and the discrimination among *C. sativa* samples was also clear. Also the distance tree analysis was performed using the NJ algorithm, under Tamura-3-parameters, with gamma distribution model, and bootstrap replicas. It was observed that *C. sativa* appears as a monophyletic group (bootstrap 99%), and the group would be the closest to *Humulus* (bootstrap 99%), corroborating the network analysis and morphological data. So, as shorter fragments have many advantages, such as being quick, easy and economical, this fragment of 561 bp of *rbcL* gene could be used for forensic identification, aiding police investigations in determining products trafficking routes. In our results, we found out a unique region as an appropriate single barcode, the *rpl32-trnL* region. Yang *et al.* (2012) also found out a single barcode, the *trnH-psbA* region, for Calamus species (Arecaceae). Based on NJ tree, the combination of *matK* + *rbcL*, a core plant barcode proposed by CBOL Plant Working Group (2009), greatly improved the species discriminating rates from 37.5% (*matK*) and 6.3% (*rbcL*) to 47.8%. Similarly, *matK* + *rbcL* had 51.8% species discrimination in the barcoding of Caryoteae (Jeanson *et al.*, 2011). As a whole, the identification power of this combination is unsatisfactory at the species level. Due to *trnH-psbA*, the species discrimination rates of *matK* + *rbcL* + *trnH-psbA* considerably improved to 62.5%. And, by ignoring the varieties of *C. yunnanensis* and *C. nambariensis*, its discrimination rates reach 100%, making it an appropriate combination barcode for *Calamus*. Other study using DNA barcode to distinguish species from Arecaceae family (Naeem *et al.*, 2014) also used *matK* and *rbcL* regions. As the results of Yang *et al.* (2012), the *matK* sequence had a lower calculated discrimination power of 66.66% and, contradictorily from the results of Yang *et al.* (2012), the *rbcL* sequence had about 90% calculated discrimination power. In our study, we had no success

amplifying a fragment of *matK*, so this region was discarded from the study. Seethapathy *et al.* (2014) used a single-locus approach to delineate the species based on genetic divergence. The *matK*, *rbcL* and *psbA-trnH* spacer exhibited the lowest mean interspecific distance (0.0357, 0.0195 and 0.1024, respectively); in contrast, *ITS2* exhibited the highest mean interspecific distance (0.393). Similarly, the intraspecific distance for *matK*, *rbcL* and *psbA-trnH* spacer was also low (0.0268, 0.0096 and 0.0027, respectively). In the case of *ITS2*, the intraspecific distance was 0.0449, which was significantly lower than the interspecific distance. Contrary for the species of our results, the *ITS2* region discriminated all the *Cassia*, *Senna* and *Chamaecrista* species.

Finally, an important application of molecular markers in the forensic science is to provide evidence of illegal use of biological material, dead or alive. Using authenticated raw material is the basic starting point in developing safe and high-quality natural products. In the food industry, for example, foods should be labeled exactly with the species they contain, according to specific standards (Nesvadbová *et al.*, 2010). The major challenge of using the DNA barcoding to authenticate food products is the adoption of this biotechnology into the development of a new regulatory process for the domestic and international trade of natural products.

## TABLES AND FIGURES

**Table 1:** Species of Palmae collected in this study for barcoding, their common name, number of individuals (n), and coordinates from where they were sampled.

<b>Family</b>	<b>Subfamily</b>	<b>Species</b>	<b>Common name</b>	<b>n</b>	<b>Coordenates</b>
		<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	Royal palm	5	30°03'06.07"S 51°10'37.95"W 29° 40' 30" S 50° 12' 26" W
Arecaceae	Arecoideae	<i>Bactris gasipaes</i>	Peach palm or pupunha	2	1°26'14.04"S 48°26'25.03"W
		<i>Euterpe edulis</i>	Juçara	5	30°04'17.08"S 51°07'14.01"W 29° 40' 30"S 50° 12' 26" W
		<i>Euterpe oleracea</i>	Açaí	2	1°26'14.04"S 48°26'25.03"W

**Table 2:** Loci used in the study for barcoding and correspondent primers sequences.

<b>Marker</b>	<b>Sequence (5'-3')</b>	<b>Reference</b>
<i>rps16-trnK</i>	F: AAA GTG GGT TTT TAT GAT CC R: TTA AAA GCC GAG TAC TCT ACC	Shaw <i>et al.</i> , 2007
<i>trnL-trnF</i>	F: GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC R: ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	Taberlet <i>et al.</i> , 1991
<i>rpl32-trnL</i>	F: CAG TTC CAA AAA AAC GTA CTT C R: CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT	Shaw <i>et al.</i> , 2007
<i>ITS2</i>	F: ATG CGA TAC TTG GTG TGA AT R: GAC GCT TCT CCA GAC TAC AAT	Chen <i>et al.</i> , 2010

**Table 3:** Characteristics of markers for the species collected in this study (Collection – this study) and the species of the five subfamilies of Palmae from Genbank (Collection – Accession Number from Genbank), including the number of individuals (n) of each marker and their variation length (bp).

Subfamily	Species	Collection	<i>rps16-trnK</i>		<i>trnL-trnF</i>		<i>rpl32-trnL</i>		<i>ITS2</i>	
			n	bp	n	bp	n	bp	n	bp
Arecoideae	<i>Acrocomia aculeata</i>	NC_037084.1								
		MG020488.1								
		HQ265759.1								
		HQ265478.1	2	754	3	367-402	2	430	5	257-349
		KX064235.1								
		KX064234.1								
		KX064233.1								
		KX064236.1								
	<i>Actinorhytis calapparia</i>	KJ634506.1							1	335
	<i>Adonidia matorbongsii</i>	KJ598243.1							1	357
	<i>Adonidia merrillii</i>	KJ598240.1							1	358
	<i>Aiphanes erinacea</i>	HQ265762.1			1	371			1	308
		HQ265480.1								
	<i>Aiphanes grandis</i>	HQ265481.1							1	305
	<i>Aiphanes hirsuta subsp. fosteriorum</i>	HQ265764.1			1	371			1	309
HQ265482.1										
<i>Aiphanes minima</i>	HQ265484.1							1	349	
<i>Aiphanes spicata</i>	HQ265485.1							1	324	

<i>Aiphanes ulei</i>	HQ265486.1							1	305
<i>Allagoptera arenaria</i>	AJ241311.1			1		391			
<i>Archontophoenix alexandrae</i>	KJ634507.1							1	335
<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	This study	2	749	5	403	2	607	5	358-360
	GQ892876.1 KJ634508.1							2	334-337
<i>Archontophoenix maxima</i>	KJ634509.1							1	328
<i>Archontophoenix myolensis</i>	KJ634510.1							1	334
<i>Archontophoenix purpurea</i>	AJ404904.1			1		397			
<i>Archontophoenix tuckeri</i>	KJ634511.1							1	327
<i>Areca catechu</i>	AB727573.1 AB271407.1							2	229-255
	AB271409.1							1	258
<i>Areca triandra</i>	AJ241308.1 AJ404912.1			2		384-391			
	AB271417.1							1	250
<i>Areca vestiaria</i>	KT312940.1								
	AB271420.1	1	526	1	402	1	613	3	263
	AB271419.1								
	AB271421.1								
<i>Astrocaryum alatum</i>	HQ265487.1							1	356
<i>Astrocaryum chambira</i>	HQ265770.1			1		371		1	340
	HQ265488.1								

<i>Astrocaryum gynacanthum</i>	HQ265771.1			1	372		1	305
	HQ265489.1							
<i>Astrocaryum malybo</i>	HQ265773.1			1	371		1	349
	HQ265491.1							
<i>Astrocaryum mexicanum</i>	HQ265774.1			1	372		1	309
	HQ265492.1							
<i>Astrocaryum minus</i>	HQ265775.1			1	372		1	341
	HQ265493.1							
<i>Astrocaryum murumuru</i>	JF745608.1			1	402			
<i>Astrocaryum rodriguesii</i>	HQ265496.1						1	353
<i>Astrocaryum sciophilum</i>	HQ265497.1						1	339
<i>Astrocaryum scopatum</i>	JF745611.1	1	754	1	402			
	F758214.1							
<i>Astrocaryum standleyanum</i>	HQ265780.1			1	371		1	337
	HQ265498.1							
<i>Astrocaryum urostachys</i>	HQ265499.1						1	339
<i>Astrocaryum vulgare</i>	HQ265782.1			1	371		1	352
	HQ265500.1							
<i>Attalea allenii</i>	AJ241312.1			1	391			
<i>Attalea crassispatha</i>	AJ241321.1			1	391			
<i>Attalea phalerata</i>	HQ265783.1			1	372			
<i>Bactris acanthocarpa</i>	HQ265501.1						1	350
<i>Bactris bifida</i>	HQ265785.1			1	371		1	306
	HQ265502.1							



<i>Bactris campestris</i>	HQ265786.1			1	372				
<i>Bactris constanciae</i>	HQ265787.1 HQ265504.1			1	371			1	346
<i>Bactris ferruginea</i>	HQ265505.1							1	339
	This study	2	752-758	2	402	2	618		
<i>Bactris gasipaes</i>	DQ445909.1 HQ265789.1 HQ265506.1			2	369-401			1	345
<i>Bactris killipii</i>	HQ265790.1 HQ265507.1			1	371			1	302
<i>Bactris major</i>	HQ265791.1 HQ265508.1			1	371			1	305
<i>Bactris maraja</i>	HQ265792.1 HQ265509.1			1	372			1	354
<i>Bactris pliniana</i>	HQ265793.1 HQ265510.1			1	372			1	350
<i>Bactris riparia</i>	HQ265511.1							1	356
<i>Bactris setulosa</i>	HQ265512.1							1	350
<i>Bactris simplicifrons</i>	HQ265513.1							1	273
<i>Balaka diffusa</i>	KJ598225.1							1	356
<i>Balaka longirostris</i>	KJ598227.1							1	356
<i>Balaka macrocarpa</i>	KJ598226.1							1	356
<i>Balaka seemanii</i>	AJ241305.1 KJ598224.1			1	390			1	356

<i>Balaka tahitensis</i>	KJ598228.1							1	356
<i>Basselinia humboldtiana</i>	KJ598246.1							1	358
<i>Basselinia velutina</i>	KJ598247.1							1	357
<i>Beccariophoenix madagascariensis</i>	AJ404918.1			1	382				
<i>Brassiophoenix drymophloeoides</i>	KJ598238.1							1	356
<i>Brassiophoenix schumannii</i>	AJ241306.1 KJ598239.1			1	391			1	356
<i>Calyptrocalyx awa</i>	KJ598249.1							1	358
<i>Calyptronoma occidentalis</i>	AJ241313.1			1	397				
<i>Carpentaria acuminata</i>	AB522465.1 KJ598218.1 KJ634512.1			1	397			2	337-359
<i>Chamaedorea seifrizii</i>	JX088667.1	1	751			1	428		
<i>Chambeyronia lepidota</i>	KJ634513.1							1	334
<i>Cocos nucifera</i>	KX028884.1 KF285453.1 KX028885.1	2	741	3	408	2	601-608		
<i>Desmoncus cirrhifer</i>	HQ265798.1 HQ265516.1			1	367			1	353
<i>Desmoncus mitis</i>	HQ265799.1 HQ265517.1			1	373			1	359
<i>Desmoncus orthacanthos</i>	HQ265518.1							1	314
<i>Desmoncus polyacanthos</i>	HQ265801.1 HQ265519.1			1	372			1	355

<i>Drymophloeus litigosus</i>	KJ598220.1							1	356
<i>Drymophloeus oliviformis</i>	KJ598221.1							1	357
<i>Dypsis lutescens</i>	AJ404901.1			1	383				
	JF274081.1								
	AJ404919.1								
	JN400503.1								
	JN400499.1								
	JN400500.1								
	JN400502.1								
<i>Elaeis guineensis</i>	HQ265520.1	1	755	2	392-402	1	610	12	184-375
	JN400495.1								
	JN400501.1								
	JN400498.1								
	JN400493.1								
	JN400497.1								
	JN400494.1								
	JN400496.1								
<i>Euterpe edulis</i>	This study	5	755-760	4	402	2	605		
	This study	2	755	2	402	2	606		
<i>Euterpe oleracea</i>	MF153991.1								
	AJ241298.1				2	391			
<i>Gastrococos crispera</i>	HQ265760.1								
					1	370			
<i>Gaussia maya</i>	AJ241287.1								
					1	378			
<i>Gronophyllum chaunostachys</i>	AJ241307.1								
					1	391			
<i>Howea belmoreana</i>	KJ598251.1							1	359
<i>Hydriastele microspadix</i>	AJ404910.1								
					1	383			
<i>Hyospathe macrorachis</i>	AJ241300.1								
					1	391			

<i>Iguanura wallichiana</i>	AJ404913.1	1	385		
<i>Jubaeopsis caffra</i>	HQ265522.1			1	351
<i>Kentiopsis magnifica</i>	AJ241789.1 AJ241303.1 KJ634514.1	2	387-394	1	334
<i>Kentiopsis oliviformis</i>	AJ241788.1 AJ241301.1	2	389-395		
<i>Kentiopsis piersoniorum</i>	AJ241302.1 KJ634515.1	1	394	1	334
<i>Laccospadix australasica</i>	AJ241304.1	1	391		
<i>Lemurophoenix halleuxii</i>	AJ404902.1	1	382		
<i>Leopoldinia pulchra</i>	AJ404899.1	1	402		
<i>Linospadix monostachya</i>	AB522466.1 AJ404908.1	2	391-396		
<i>Linospadix monostachyos</i>	KJ634516.1			1	337
<i>Manicaria saccifera</i>	AJ241297.1	1	391		
<i>Marojejya darianii</i>	AJ404917.1	1	387		
<i>Masoala madagascariensis</i>	AJ404916.1	1	387		
<i>Nenga pumila var. pachystachya</i>	AB271427.1 AB271424.1 AB271423.1			3	244-251
<i>Neonicholsonia watsonii</i>	AJ241299.1	1	391		
<i>Normanbya normanbyi</i>	KJ598235.1			1	358

<i>Orania lauterbachiana</i>	AJ241296.1	1	391
<i>Pinanga arinasae</i>	AB271249.1 AB271248.1	2	250-252
<i>Pinanga batanensis</i>	AB271259.1 AB271261.1 AB271260.1	3	253
<i>Pinanga brevipes</i>	AB271266.1 AB271267.1	2	195-198
<i>Pinanga chaiana</i>	AB271275.1 AB271277.1 AB271276.1	3	255
<i>Pinanga curranii</i>	AB271292.1 AB271291.1 AB271290.1	3	250-253
<i>Pinanga egregia</i>	AB271300.1 AB271299.1	2	248-252
<i>Pinanga heterophylla</i>	AB271312.1 AB271313.1	2	252
<i>Pinanga insignis</i>	AB271314.1 AB271315.1	2	253
<i>Pinanga javana</i>	AB271317.1 AB271316.1 AB271319.1 AB271318.1 AB271320.1	5	250-253
<i>Pinanga maculata</i>	AB271332.1	1	253
<i>Pinanga malaiana</i>	AB271335.1 AB271333.1	2	200-253
<i>Pinanga mirabilis</i>	AB271338.1 AB271340.1	2	255

<i>Pinanga philippinensis</i>	AB271351.1 AB271350.1							2	252
<i>Pinanga rumphiana</i>	AB271368.1 AB271370.1 AB271372.1 AB271371.1							4	226-253
<i>Pinanga subruminata</i>	AB271391.1							1	238
<i>Pinanga urosperma</i>	AB271397.1 AB271399.1							2	226-243
<i>Podococcus barteri</i>	AJ241295.1 KR347117.1	1	739	1	397	1	542		
<i>Ponapea ledermanniana</i>	KJ598241.1							1	359
<i>Ptychococcus lepidotus</i>	KJ598236.1							1	349
<i>Ptychococcus paradoxus</i>	KJ598237.1							1	349
<i>Ptychosperma burretianum</i>	KJ598217.1 MH766939.1							2	271-357
<i>Ptychosperma elegans</i>	AB522467.1			1	397				
<i>Ptychosperma gracile</i>	KJ598210.1							1	358
<i>Ptychosperma lauterbachii</i>	KJ598215.1							1	357
<i>Ptychosperma lineare</i>	KJ598213.1							1	357
<i>Ptychosperma macarthurii</i>	KJ598207.1							1	357
<i>Ptychosperma propinquum</i>	KJ598206.1							1	357
<i>Ptychosperma salomonense</i>	KJ598209.1							1	357

	<i>Ptychosperma sanderianum</i>	KJ598211.1						1	357
	<i>Reinhardtia gracilis var. rostrata</i>	HQ265523.1						1	337
	<i>Reinhardtia simplex</i>	AJ404900.1			1	383			
	<i>Rhopalostylis baueri</i>	AJ404906.1 KJ598248.1			1	386		1	357
	<i>Rhopalostylis sapida</i>	EU331104.1						1	338
	<i>Roscheria melanochaetes</i>	AJ404914.1			1	394			
	<i>Solfia samoensis</i>	KJ598242.1						1	357
	<i>Syagrus coronata</i>	KT896548.1	1	741	1	409	1	602	
	<i>Syagrus smithii</i>	AJ241310.1			1	398			
	<i>Veitchia arecina</i>	KT312917.1 AJ404909.1 KJ598229.1	1	748	2	391-402	1	541	
	<i>Veitchia pachyclada</i>	KJ598223.1						1	356
	<i>Veitchia subdisticha</i>	KJ598222.1						1	356
	<i>Voanioala gerardii</i>	HQ265807.1			1	371			
	<i>Wodyetia bifurcata</i>	KJ598219.1						1	358
<b>Calamoideae</b>	<i>Calamus arborescens</i>	KJ532809.1						1	350
	<i>Calamus baratangensis</i>	KJ532811.1						1	351
	<i>Calamus caesius</i>	KJ532821.1						1	352
	<i>Calamus caryotoides</i>	JX088663.1	1	757			1	595	

<i>Calamus delessertianus</i>	KJ532824.1	1	275
<i>Calamus dransfieldii</i>	KJ532827.1	1	349
<i>Calamus erectus</i>	KJ532828.1	1	349
<i>Calamus flagellum</i>	KJ532831.1	1	349
<i>Calamus gracilis</i>	KJ532840.1	1	270
<i>Calamus laccifer</i>	KJ532851.1	1	270
<i>Calamus lakshmanae</i>	KJ532854.1	1	349
<i>Calamus longisetus</i>	KJ532862.1	1	349
<i>Calamus nagbettai</i>	KJ532866.1	1	344
<i>Calamus nambariensis</i>	KJ532845.1	1	349
<i>Calamus prasinus</i>	KJ532870.1	1	275
<i>Calamus tenuis</i>	KJ532885.1 KJ532884.1	2	353-354
<i>Calamus thwaitesi</i>	KJ532886.1	1	351
<i>Calamus unifarius</i>	KJ532888.1	1	349
<i>Calamus vattayila</i>	KJ532891.1	1	350
<i>Calamus viminalis</i>	KJ532896.1 KJ532894.1	2	270-272
<i>Daemonorops aurea</i>	KJ532903.1	1	349
<i>Daemonorops manii</i>	KJ532913.1	1	349



	<i>Daemonorops wrightmyoensis</i>	KJ532918.1						1	349
	<i>Eremospatha macrocarpa</i>	KT312932.1	1	735			1	469	
	<i>Eugeissona tristis</i>	KT312931.1	1	689			1	477	
	<i>Mauritia flexuosa</i>	KT312914.1	1	740			1	468	
	<i>Metroxylon warburgii</i>	KT312926.1	1	716			1	601	
	<i>Pigafetta elata</i>	KT312923.1	1	746			1	599	
	<i>Salacca ramosiana</i>	KT312921.1	1	748			1	646	
<b>Ceroxyloideae</b>	<i>Ammandra decasperma</i>	AJ404922.1				1	391		
	<i>Aphandra natalia</i>	AJ404921.1 FJ719003.1				1	391	1	338
	<i>Ceroxylon echinulatum</i>	JF745607.1 FJ718999.1				1	402	1	336
	<i>Ceroxylon parvifrons</i>	FJ719000.1						1	336
	<i>Ceroxylon quindiuense</i>	AJ242151.1						1	313
	<i>Ceroxylon vogelianum</i>	FJ719001.1						1	336
	<i>Phytelephas aequatorialis</i>	KT312924.1	1	747		1	402	1	460
	<i>Phytelephas seemannii</i>	FJ719011.1						1	209
	<i>Phytelephas tenuicaulis</i>	FJ719010.1						1	211
	<i>Pseudophoenix vinifera</i>	JX088662.1	1	724			1	557	
	<i>Ravenea glauca</i>	AB522463.1				1	396		

	<i>Ravenea rivularis</i>	AB522464.1			1	398		
	<i>Ravenea xerophila</i>	FJ719002.1					1	337
<b>Coryphoideae</b>	<i>Acoelorrhaphe wrightii</i>	KT312941.1	1	761	1	408	1	606
	<i>Arenga caudata</i>	JX088662.1 KT312939.1	1	756			1	422
	<i>Bismarckia nobilis</i>	JX088664.1	1	591			1	613
	<i>Borassodendron machadonis</i>	KT312937.1	1	755			1	625
	<i>Borassus flabellifer</i>	KP901247.1	1	752			1	613
	<i>Brahea brandegeei</i>	KT312936.1 AB521753.1	1	773	2	405-406	1	609
	<i>Caryota mitis</i>	KT312915.1	1	748	1	394	1	630
	<i>Chamaerops humilis</i>	KT312935.1	1	775			1	612
	<i>Chuniophoenix nana</i>	KT312934.1	1	759			1	605
	<i>Colpotherinax cookii</i>	KT261428.1	1	752	1	402	1	619
	<i>Colpotherinax wrightii</i>	AB522432.1			1	401		
	<i>Corypha lecomtei</i>	KT312933.1	1	761			1	487
	<i>Latania loddigesii</i>	KY700544.1			1	355		
	<i>Leucothrinax morrisii</i>	KT312929.1	1	764	1	403	1	541
	<i>Licuala paludosa</i>	KT312928.1	1	420			1	619
	<i>Livistona alfredii</i>	AB522434.1			1	401		

<i>Livistona carinensis</i>	AB522437.1			1	406		
<i>Livistona chinensis</i>	AJ241263.1			1	385		
<i>Livistona humilis</i>	AB522444.1			1	401		
<i>Livistona lanuginosa</i>	AB522447.1			1	401		
<i>Livistona muelleri</i>	AB522450.1			1	401		
<i>Livistona victoriae</i>	AB522456.1			1	401		
<i>Lodoicea maldivica</i>	KT312927.1	1	627			1	615
<i>Phoenix dactylifera</i>	MF176947.1						
	MF197495.1						
	MF197494.1						
	GU811709.2	7	755-770	1	402	5	560-561
	FJ212316.3						
	JN375330.1						
<i>Pritchardia thurstonii</i>	KT312922.1	1	727	1	413	1	549
<i>Rhapidophyllum hystrix</i>	EF635381.1						1 329
<i>Sabal bermudana</i>	AJ241271.1			1	391		
<i>Sabal domingensis</i>	KF928963.1	1	757	1	403	1	619
<i>Sabal pumos</i>	EF688506.1						1 347
<i>Serenoa repens</i>	KT312920.1	1	771	2	407-408	1	580
	AB522459.1						
<i>Tahina spectabilis</i>	KT312919.1	1	494			1	410
<i>Trachycarpus fortunei</i>	FJ490768.1			3	385-402		
	AB522460.1						1 311

		AJ404892.1							
		EF635376.1							
	<i>Trachycarpus martianus</i>	EF635378.1						1	333
	<i>Trachycarpus nanus</i>	EF635377.1						1	310
	<i>Trachycarpus wagnerianus</i>	EF635379.1						1	335
	<i>Trithrinax brasiliensis</i>	KT312918.1	1	759	1	407	1	564	
	<i>Trithrinax campestris</i>	EF635382.1						1	323
	<i>Wallichia densiflora</i>	KT312916.1	1	805			1	557	
	<i>Washingtonia robusta</i>	KT312942.1	1	757	1	402	1	609	
<b>Nypoideae</b>	<i>Nypa fruticans</i>	KT312925.1	1	773			1	613	
<b>Average</b>				735		392		568	311

**Table 4:** Success rates of amplification and sequencing for *rps16-trnK*, *trnL-trnF*, *rpl32-trnL* and *ITS2* markers.

<b>Barcode markers</b>	<i>rps16-trnK</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>rpl32-trnL</i>	<i>ITS2</i>
<b>Number of samples</b>	14	14	14	14
<b>PCR success rate (%)</b>	100	100	100	100
<b>Sequencing success</b>	11	13	8	5
<b>Sequencing success rate (%)</b>	78.6	92.9	57.1	35.7

**Table 5:** Transition and transversion rates of *rps16-trnK* nucleotide sequences in *Palmae*. Substitution pattern and rates were estimated under the Tamura-Nei (1993) model. Rates of different transitional substitutions are shown in bold and those of transversional substitutions are shown in italics.

	<b>A</b>	<b>T/U</b>	<b>C</b>	<b>G</b>
<b>A</b>	-	<i>8.02</i>	<i>3.08</i>	<b>10.77</b>
<b>T/U</b>	<i>5.87</i>	-	<b>8.21</b>	<i>3.30</i>
<b>C</b>	<i>5.87</i>	<b>21.34</b>	-	<i>3.30</i>
<b>G</b>	<b>19.15</b>	<i>8.02</i>	<i>3.08</i>	-

**Table 6:** Transition and transversion rates of *trnL-trnF* nucleotide sequences in *Palmae*. Substitution pattern and rates were estimated under the Tamura-Nei (1993) model. Rates of different transitional substitutions are shown in bold and those of transversional substitutions are shown in italics.

	<b>A</b>	<b>T/U</b>	<b>C</b>	<b>G</b>
<b>A</b>	-	<i>7.77</i>	<i>4.05</i>	<b>9.64</b>
<b>T/U</b>	<i>6.59</i>	-	<b>8.38</b>	2.68
<b>C</b>	<i>6.59</i>	<b>16.08</b>	-	2.68
<b>G</b>	<b>23.70</b>	<i>7.77</i>	<i>4.05</i>	-

**Table 7:** Transition and transversion rates of *rpl32-trnL* nucleotide sequences in *Palmae*. Substitution pattern and rates were estimated under the Tamura-Nei (1993) model. Rates of different transitional substitutions are shown in bold and those of transversional substitutions are shown in italics.

	<b>A</b>	<b>T/U</b>	<b>C</b>	<b>G</b>
<b>A</b>	-	<i>8.16</i>	<i>2.66</i>	<b>7.72</b>
<b>T/U</b>	<i>7.76</i>	-	<b>7.22</b>	<i>3.05</i>
<b>C</b>	<i>7.76</i>	<b>22.13</b>	-	<i>3.05</i>
<b>G</b>	<b>19.68</b>	<i>8.16</i>	<i>3.66</i>	-



**Table 8:** Transition and transversion rates of *ITS2* nucleotide sequences in *Palmae*. Substitution pattern and rates were estimated under the Tamura-Nei (1993) model. Rates of different transitional substitutions are shown in bold and those of transversional substitutions are shown in italics.

	<b>A</b>	<b>T/U</b>	<b>C</b>	<b>G</b>
<b>A</b>	-	<i>1.72</i>	<i>5.12</i>	<b>18.65</b>
<b>T/U</b>	<i>1.92</i>	-	<b>34.98</b>	<i>4.75</i>
<b>C</b>	<i>1.92</i>	<b>11.78</b>	-	<i>4.75</i>
<b>G</b>	<b>7.55</b>	<i>1.72</i>	<i>5.12</i>	-

**Table 9:** Alignment length and distance summary analysis for all the possible DNA barcodes by the Kimura-2-parameter method. “-“ correspond to those distance that could not be calculated. When the marker has two lines, the upper line is the distance calculated only for the species collected in this study, and the lower one is the distance calculated for both species collected in this study and from Genbank.

Barcode	No. of specimens/ No. of species	Alignment length (bp)	Intraespecific Distance	Interespecific Distance	
			Mean intraspecific distance (range)	Mean within genus distance (range)	Mean within family distance (range)
<i>rps16-trnK</i>	11/4	771	0.02 (0.00-0.27)	0.27 (0.27-0.27)	2.10 (1.22-2.99)
	61/45	949	0.51 (0.00-3.12)	0.27 (0.27-0.27)	3.29 (0.00-8.30)
<i>trnL-trnF</i>	13/4	403	0.00 (0.00-0.00)	0.25 (0.25-0.25)	1.35 (1.00-1.52)
	122/95	440	0.07 (0.00-1.29)	0.28 (0.00-1.28)	1.21 (0.00-3.65)
<i>rpl32-trnL</i>	8/4	624	0.00 (0.00-0.00)	1.50 (1.50-1.50)	3.41 (1.69-4.95)
	55/44	860	0.00 (0.00-0.00)	1.67 (1.67-1.67)	4.29 (0.24-9.29)
ITS2	5/1	360	14.63 (0.00-24.53)	0.00 (0.00-0.00)	0.00 (0.00-0.00)
	193/141	473	6.26 (0.00-24.05)	5.30 (0.00-27.07)	24.65 (0.91-59.72)
<i>rps16-trnK+ trnL-trnF</i>	10/4	1174	0.02 (0.00-0.17)	0.26 (0.26-0.26)	1.84 (1.23-2.47)
	30/22	1229	0.02 (0.00-0.17)	0.26 (0.26-0.26)	1.86 (0.17-3.15)
<i>rps16-trnK+ rpl32-trnL</i>	8/4	1395	0.04 (0.00-0.15)	0.82 (0.82-0.82)	2.74 (2.34-3.63)
	55/44	1801	0.01 (0.00-0.15)	0.82 (0.82-0.82)	3.81 (0.38-8.11)
<i>rps16-trnK+ ITS2</i>	2/1	1109	0.09 (0.09-0.09)	-	-
<i>trnL-trnF+ rpl32-trnL</i>	8/4	1027	0.00 (0.00-0.00)	1.00 (1.00-1.00)	2.56 (1.62-3.35)
	27/21	1143	0.00 (0.00-0.00)	1.00 (1.00-1.00)	2.57 (0.21-4.30)
<i>trnL-trnF+ ITS2</i>	5/1	763	6.16 (0.00-10.29)	-	-
<i>rpl32-trnL+ ITS2</i>	2/1	967	0.10 (0.10-0.10)	-	-
<i>rps16-trnK+ trnL-trnF+ rpl32-trnL</i>	8/4	1798	0.03 (0.00-0.11)	0.69 (0.69-0.69)	2.41 (2.09-3.02)
	27/21	1937	0.02 (0.00-0.11)	0.69 (0.69-0.69)	2.33 (0.29-3.66)

<i>rps16-trnK+ trnL-trnF+ ITS2</i>	2/1	1512	0.07 (0.07-0.07)	-	-
<i>rps16-trnK+ rpl32-trnL+ ITS2</i>	2/1	1716	0.06 (0.06-0.06)	-	-
<i>trnL-trnF+ rpl32-trnL+ ITS2</i>	2/1	1370	0.07 (0.07-0.07)	-	-
<i>rps16-trnK+ trnL-trnF+ rpl32-trnL+ ITS2</i>	2/1	2119	0.05 (0.05-0.05)	-	-

**Table 10:** Species identification power of the DNA markers (number of species grouped in a clade/total number of species used in the tree) and bootstrap values, considering only the species collected in the study and considering both species collected and those from Genbank, based on NJ tree-based method.

	<i>rps16-trnK</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>rpl32-trnL</i>	<i>ITS2</i>	<i>rps16-trnK + trnL-trnF</i>	<i>rps16-trnK + rpl32-trnL</i>	<i>trnL-trnF + rpl32-trnL</i>	<i>rps16-trnK + trnL-trnF + rpl32-trnL</i>
<b>This study</b>	75% (3/4)	75% (3/4)	100% (4/4)	-	75% (3/4)	100% (4/4)	100% (4/4)	100% (4/4)
Bootstrap values	87-100	64-87	55-100		94-100	98-100	93-100	99-100
<b>Genbank</b>	87,5% (7/8)	60% (8/15)	100% (8/8)	70,8% (17/24)	83,3% (5/6)	100% (8/8)	100% (6/6)	100% (6/6)
Bootstrap values	40-100	63-99	92-100	59-100	65-100	90-100	89-100	88-100

**Table 11:** Barcoding gap analysis with the collected species in this study for the candidate markers, with the nearest neighbor (NN) species and the distance to it.

Marker	Order	Family	Species	Mean intra-sp	Nearest neighbour species	Distance to NN
<i>rps16-trnK</i>	Arecales	Arecaceae	<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	0.00	<i>Euterpe oleraceae</i>	1.22
	Arecales	Arecaceae	<i>Bactris gasipaes</i>	0.00	<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	2.17
	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe edulis</i>	0.00	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.27
	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.27	<i>Euterpe edulis</i>	0.27
<i>trnL-trnF</i>	Arecales	Arecaceae	<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	0.00	<i>Bactris gasipaes</i>	1.00
	Arecales	Arecaceae	<i>Bactris gasipaes</i>	0.00	<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	1.00
	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe edulis</i>	0.00	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.25
<i>rpl32-trnL</i>	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.00	<i>Euterpe edulis</i>	0.25
	Arecales	Arecaceae	<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	0.00	<i>Euterpe edulis</i>	3.41
	Arecales	Arecaceae	<i>Bactris gasipaes</i>	0.00	<i>Euterpe edulis</i>	1.69
	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe edulis</i>	0.00	<i>Euterpe oleraceae</i>	1.50
<i>rps16-trnK + trnL-trnF</i>	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.00	<i>Euterpe edulis</i>	1.50
	Arecales	Arecaceae	<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	0.00	<i>Euterpe oleraceae</i>	1.23
	Arecales	Arecaceae	<i>Bactris gasipaes</i>	0.00	<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	1.76
	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe edulis</i>	0.00	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.26
<i>rps16-trnK + rpl32-trnL</i>	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.17	<i>Euterpe edulis</i>	0.26
	Arecales	Arecaceae	<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	0.00	<i>Euterpe oleraceae</i>	2.34
	Arecales	Arecaceae	<i>Bactris gasipaes</i>	0.00	<i>Euterpe edulis</i>	2.41
	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe edulis</i>	0.00	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.82
<i>trnL-trnF + rpl32-trnL</i>	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.15	<i>Euterpe edulis</i>	0.82
	Arecales	Arecaceae	<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	0.00	<i>Euterpe edulis</i>	2.65
	Arecales	Arecaceae	<i>Bactris gasipaes</i>	0.00	<i>Euterpe edulis</i>	1.62
	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe edulis</i>	0.00	<i>Euterpe oleraceae</i>	1.00
<i>rps16-trnK + trnL-trnF +</i>	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.00	<i>Euterpe edulis</i>	1.00
	Arecales	Arecaceae	<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	0.00	<i>Euterpe oleraceae</i>	2.09
<i>trnL-trnF +</i>	Arecales	Arecaceae	<i>Bactris gasipaes</i>	0.00	<i>Euterpe edulis</i>	2.20

---

<i>rpl32-trnL</i>	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe edulis</i>	0.00	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.69
	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.11	<i>Euterpe edulis</i>	0.69

---

**Table 12:** Barcoding gap analysis with the collected species in this study and the species from Genbank for the candidate markers, with the nearest neighbor (NN) species and the distance to it.

Marker	Order	Family	Species	Mean intra-sp	Nearest neighbour species	Distance to NN
<i>rps16-trnK</i>	Arecales	Arecaceae	<i>Acrocomia aculeata</i>	0.00	<i>Astrocaryum scopatum</i>	0.00
	Arecales	Arecaceae	<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	0.00	<i>Elaeis guineensis</i>	0.94
	Arecales	Arecaceae	<i>Arenga caudata</i>	0.00	<i>Wallichia densiflora</i>	0.67
	Arecales	Arecaceae	<i>Bactris gasipaes</i>	0.00	<i>Astrocaryum scopatum</i>	0.27
	Arecales	Arecaceae	<i>Cocos nucifera</i>	0.00	<i>Elaeis guineensis</i>	0.27
	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe edulis</i>	0.00	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.27
	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.27	<i>Euterpe edulis</i>	0.27
<i>trnL-trnF</i>	Arecales	Arecaceae	<i>Phoenix dactylifera</i>	0.89	<i>Syagrus coronata</i>	1.79
	Arecales	Arecaceae	<i>Acrocomia aculeata</i>	0.00	<i>Elaeis guineensis</i>	0.00
	Arecales	Arecaceae	<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	0.00	<i>Rhopalostylis baueri</i>	0.00
	Arecales	Arecaceae	<i>Areca triandra</i>	0.00	<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	0.26
	Arecales	Arecaceae	<i>Bactris gasipaes</i>	0.00	<i>Beccariophoenix madagascariensis</i>	0.26
	Arecales	Arecaceae	<i>Brahea brandegeei</i>	0.00	<i>Acoelorrhaphe wrightii</i>	0.25
	Arecales	Arecaceae	<i>Cocos nucifera</i>	0.00	<i>Syagrus coronata</i>	0.25
	Arecales	Arecaceae	<i>Elaeis guineensis</i>	1.29	<i>Acrocomia aculeata</i>	0.00
	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe edulis</i>	0.00	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.25
	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.13	<i>Euterpe edulis</i>	0.25
	Arecales	Arecaceae	<i>Kentiopsis magnifica</i>	0.52	<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	0.00
	Arecales	Arecaceae	<i>Kentiopsis oliviformis</i>	0.52	<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	0.00
	Arecales	Arecaceae	<i>Linospadix monostachya</i>	0.00	<i>Laccospadix australasica</i>	0.00
	Arecales	Arecaceae	<i>Trachycarpus fortunei</i>	0.00	<i>Acoelorrhaphe wrightii</i>	0.25
<i>rpl32-trnL</i>	Arecales	Arecaceae	<i>Veitchia arecina</i>	0.26	<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	0.00
	Arecales	Arecaceae	<i>Acrocomia aculeata</i>	0.00	<i>Bactris gasipaes</i>	1.18
	Arecales	Arecaceae	<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	0.00	<i>Veitchia arecina</i>	1.35
	Arecales	Arecaceae	<i>Arenga caudata</i>	0.00	<i>Caryota mitis</i>	0.24

	Arecales	Arecaceae	<i>Bactris gasipaes</i>	0.00	<i>Acrocomia aculeata</i>	1.18
	Arecales	Arecaceae	<i>Cocos nucifera</i>	0.00	<i>Podococcus barteri</i>	0.83
	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe edulis</i>	0.00	<i>Podococcus barteri</i>	0.63
	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.00	<i>Podococcus barteri</i>	0.83
	Arecales	Arecaceae	<i>Phoenix dactylifera</i>	0.00	<i>Brahea brandegeei</i>	0.90
	Arecales	Arecaceae	<i>Acrocomia aculeata</i>	2.63	<i>Astrocaryum chambira</i>	3.17
	Arecales	Arecaceae	<i>Archontopoenix cunninghamiana</i>	13.46	<i>Chambeyronia lepidota</i>	1.21
	Arecales	Arecaceae	<i>Areca catechu</i>	4.11	<i>Areca vestiaria</i>	4.15
	Arecales	Arecaceae	<i>Areca vestiaria</i>	0.77	<i>Areca catechu</i>	4.15
	Arecales	Arecaceae	<i>Calamus tenuis</i>	0.00	<i>Calamus lakshmanae</i>	0.00
	Arecales	Arecaceae	<i>Calamus viminalis</i>	0.00	<i>Calamus arborescens</i>	2.26
	Arecales	Arecaceae	<i>Carpentaria acuminata</i>	0.00	<i>Ptychosperma lauterbachii</i>	4.36
	Arecales	Arecaceae	<i>Elaeis guineensis</i>	8.34	<i>Aphandra natalia</i>	18.00
	Arecales	Arecaceae	<i>Nenga pumila var. pachystachya</i>	15.39	<i>Archontopoenix cunninghamiana</i>	16.41
	Arecales	Arecaceae	<i>Pinanga arinasae</i>	3.78	<i>Pinanga javana</i>	0.40
	Arecales	Arecaceae	<i>Pinanga batanensis</i>	1.61	<i>Pinanga maculata</i>	1.60
<b>ITS2</b>	Arecales	Arecaceae	<i>Pinanga chaiana</i>	0.53	<i>Pinanga mirabilis</i>	0.39
	Arecales	Arecaceae	<i>Pinanga curranii</i>	0.27	<i>Pinanga egregia</i>	4.11
	Arecales	Arecaceae	<i>Pinanga egregia</i>	3.34	<i>Pinanga philippinensis</i>	0.40
	Arecales	Arecaceae	<i>Pinanga heterophylla</i>	0.40	<i>Pinanga egregia</i>	1.20
	Arecales	Arecaceae	<i>Pinanga insignis</i>	0.40	<i>Pinanga batanensis</i>	2.00
	Arecales	Arecaceae	<i>Pinanga javana</i>	1.80	<i>Pinanga arinasae</i>	0.40
	Arecales	Arecaceae	<i>Pinanga malaiana</i>	7.01	<i>Pinanga chaiana</i>	4.94
	Arecales	Arecaceae	<i>Pinanga mirabilis</i>	0.39	<i>Pinanga chaiana</i>	0.39
	Arecales	Arecaceae	<i>Pinanga philippinensis</i>	0.00	<i>Pinanga egregia</i>	0.40
	Arecales	Arecaceae	<i>Pinanga rumphiana</i>	0.72	<i>Pinanga batanensis</i>	1.79
	Arecales	Arecaceae	<i>Pinanga urosperma</i>	4.61	<i>Pinanga batanensis</i>	4.61
	Arecales	Arecaceae	<i>Ptychosperma burretianum</i>	0.00	<i>Ptychosperma propinquum</i>	0.00
<b>rps16-trnK +</b>	Arecales	Arecaceae	<i>Acrocomia aculeata</i>	0.00	<i>Bactris gasipaes</i>	0.35



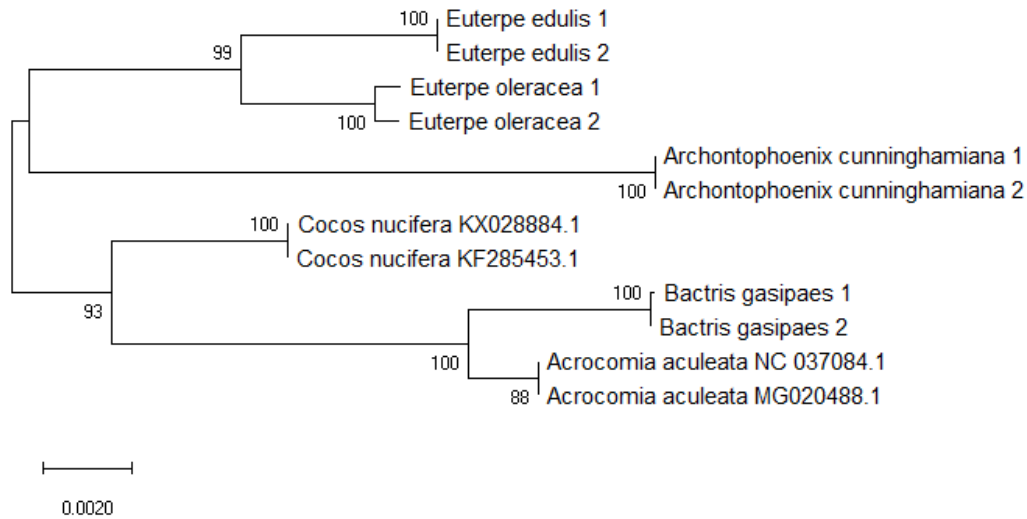
<b><i>trnL-trnF</i></b>	Arecales	Arecaceae	<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	0.00	<i>Veitchia arecina</i>	0.61
	Arecales	Arecaceae	<i>Bactris gasipaes</i>	0.00	<i>Acrocomia aculeata</i>	0.35
	Arecales	Arecaceae	<i>Cocos nucifera</i>	0.00	<i>Elaeis guineensis</i>	0.44
	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe edulis</i>	0.00	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.26
	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.17	<i>Euterpe edulis</i>	0.26
<b><i>rps16-trnK + rpl32-trnL</i></b>	Arecales	Arecaceae	<i>Acrocomia aculeata</i>	0.00	<i>Bactris gasipaes</i>	0.59
	Arecales	Arecaceae	<i>Archontopoenix cunninghamiana</i>	0.00	<i>Veitchia arecina</i>	1.11
	Arecales	Arecaceae	<i>Arenga caudata</i>	0.00	<i>Caryota mitis</i>	0.52
	Arecales	Arecaceae	<i>Bactris gasipaes</i>	0.00	<i>Acrocomia aculeata</i>	0.59
	Arecales	Arecaceae	<i>Cocos nucifera</i>	0.00	<i>Elaeis guineensis</i>	0.38
	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe edulis</i>	0.00	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.82
	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.15	<i>Euterpe edulis</i>	0.82
	Arecales	Arecaceae	<i>Phoenix dactylifera</i>	0.00	<i>Colpotherinax cookii</i>	1.62
	Arecales	Arecaceae	<i>Acrocomia aculeata</i>	0.00	<i>Syagrus coronata</i>	0.85
	Arecales	Arecaceae	<i>Archontopoenix cunninghamiana</i>	0.00	<i>Veitchia arecina</i>	0.76
<b><i>trnL-trnF + rpl32-trnL</i></b>	Arecales	Arecaceae	<i>Bactris gasipaes</i>	0.00	<i>Acrocomia aculeata</i>	0.97
	Arecales	Arecaceae	<i>Cocos nucifera</i>	0.00	<i>Syagrus coronata</i>	0.70
	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe edulis</i>	0.00	<i>Euterpe oleraceae</i>	1.00
	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.00	<i>Euterpe edulis</i>	1.00
	Arecales	Arecaceae	<i>Acrocomia aculeata</i>	0.00	<i>Bactris gasipaes</i>	0.57
<b><i>rps16-trnK + trnL-trnF + rpl32-trnL</i></b>	Arecales	Arecaceae	<i>Archontopoenix cunninghamiana</i>	0.00	<i>Veitchia arecina</i>	0.84
	Arecales	Arecaceae	<i>Bactris gasipaes</i>	0.00	<i>Acrocomia aculeata</i>	0.57
	Arecales	Arecaceae	<i>Cocos nucifera</i>	0.00	<i>Syagrus coronata</i>	0.63
	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe edulis</i>	0.00	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.69
	Arecales	Arecaceae	<i>Euterpe oleraceae</i>	0.11	<i>Euterpe edulis</i>	0.69

**Table 13:** Results from amplification and sequencing of processed palm heart for the target regions for DNA barcode.

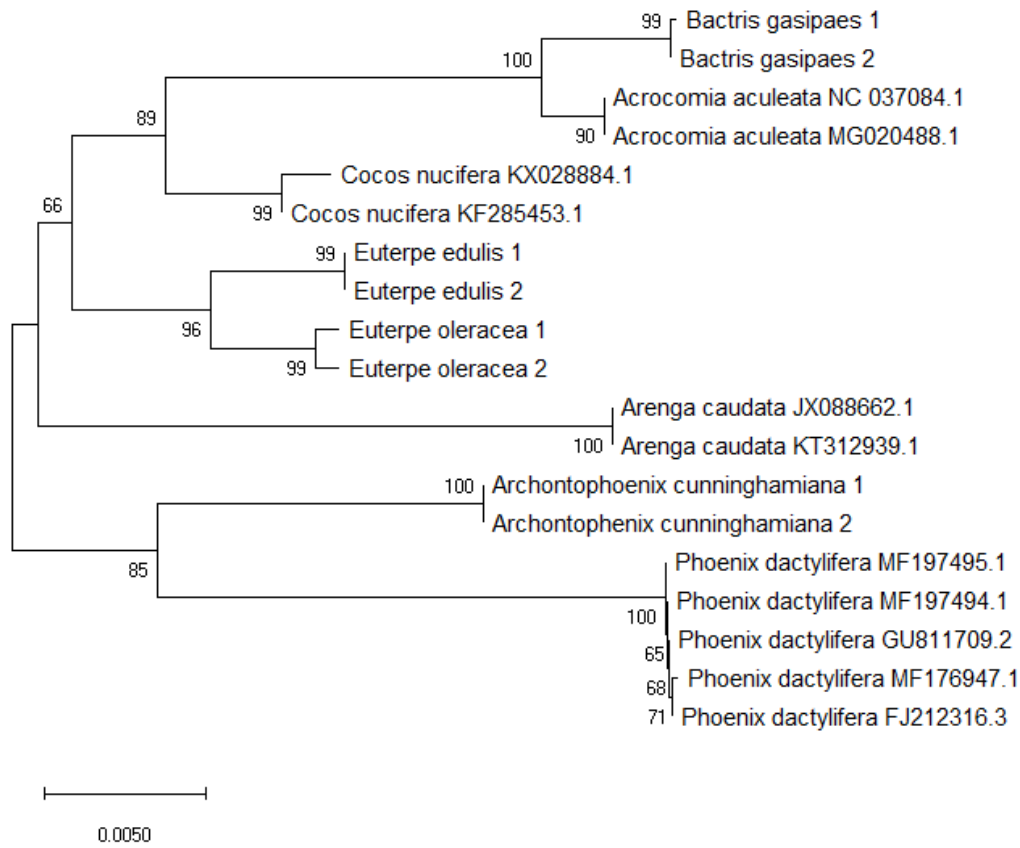
		DNA isolation	<i>rps16-trnK</i>		<i>trnL-trnF</i>		<i>rpl32-trnL</i>		<i>ITS2</i>	
			Amplification	Sequencing	Amplification	Sequencing	Amplification	Sequencing	Amplification	Sequencing
Açaí	Qiagen	OK			OK	OK			OK	OK
	CTAB	OK			OK	OK			OK	OK
Juçara	Qiagen	OK			OK		OK		OK	OK
	CTAB	OK								
Pupunha	Qiagen	OK	OK		OK				OK	OK
	CTAB	OK								
Royal	Qiagen	OK							OK	
Palm	CTAB	OK								

OK= Success in this process.

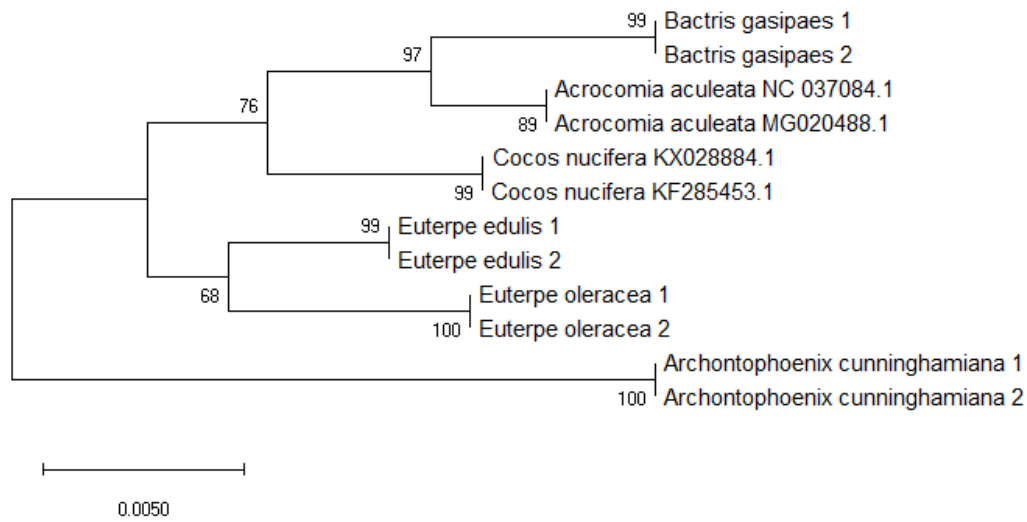
**Figure 1:** A taxon identification tree using the neighbor-joining (NJ) analysis of Kimura-2-parameter distances based on combined *rps16-trnK* + *trnL-trnF* + *rpl32-trnL* sequences. Bootstrap values are shown above the branches. Species names from Genbank are followed by accession numbers.



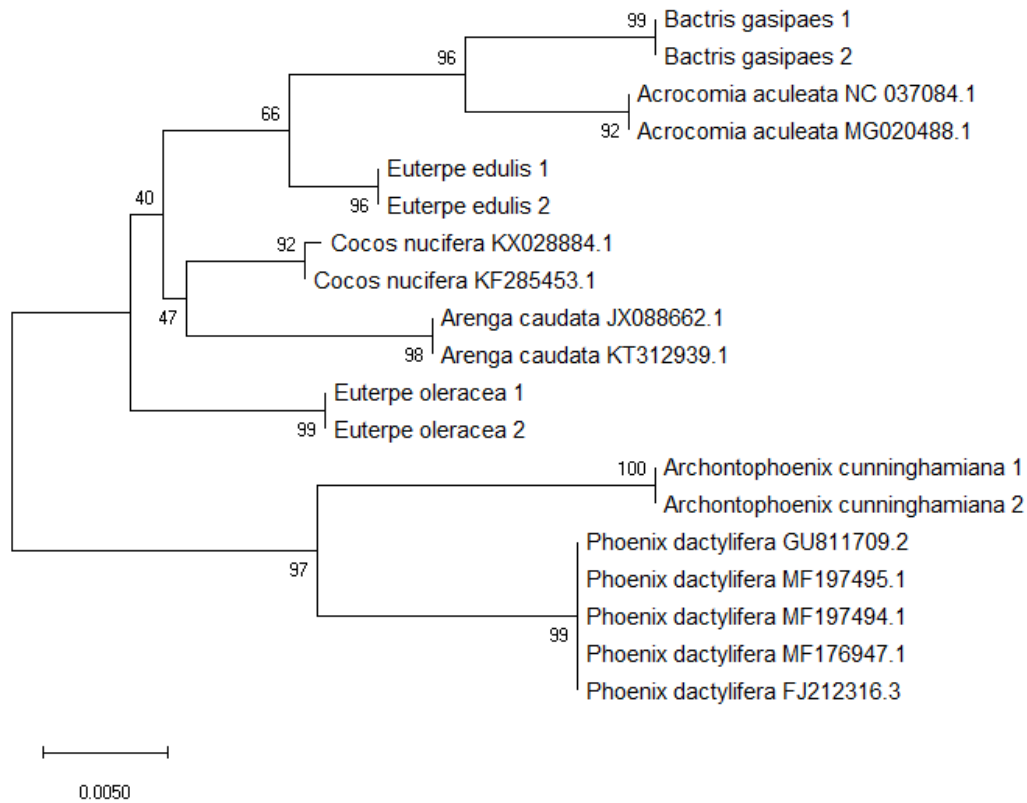
**Figure 2:** A taxon identification tree using the neighbor-joining (NJ) analysis of Kimura-2-parameter distances based on combined *rps16-trnK* + *rpl32-trnL* sequences. Bootstrap values are shown above the branches. Species names from Genbank are followed by accession numbers.



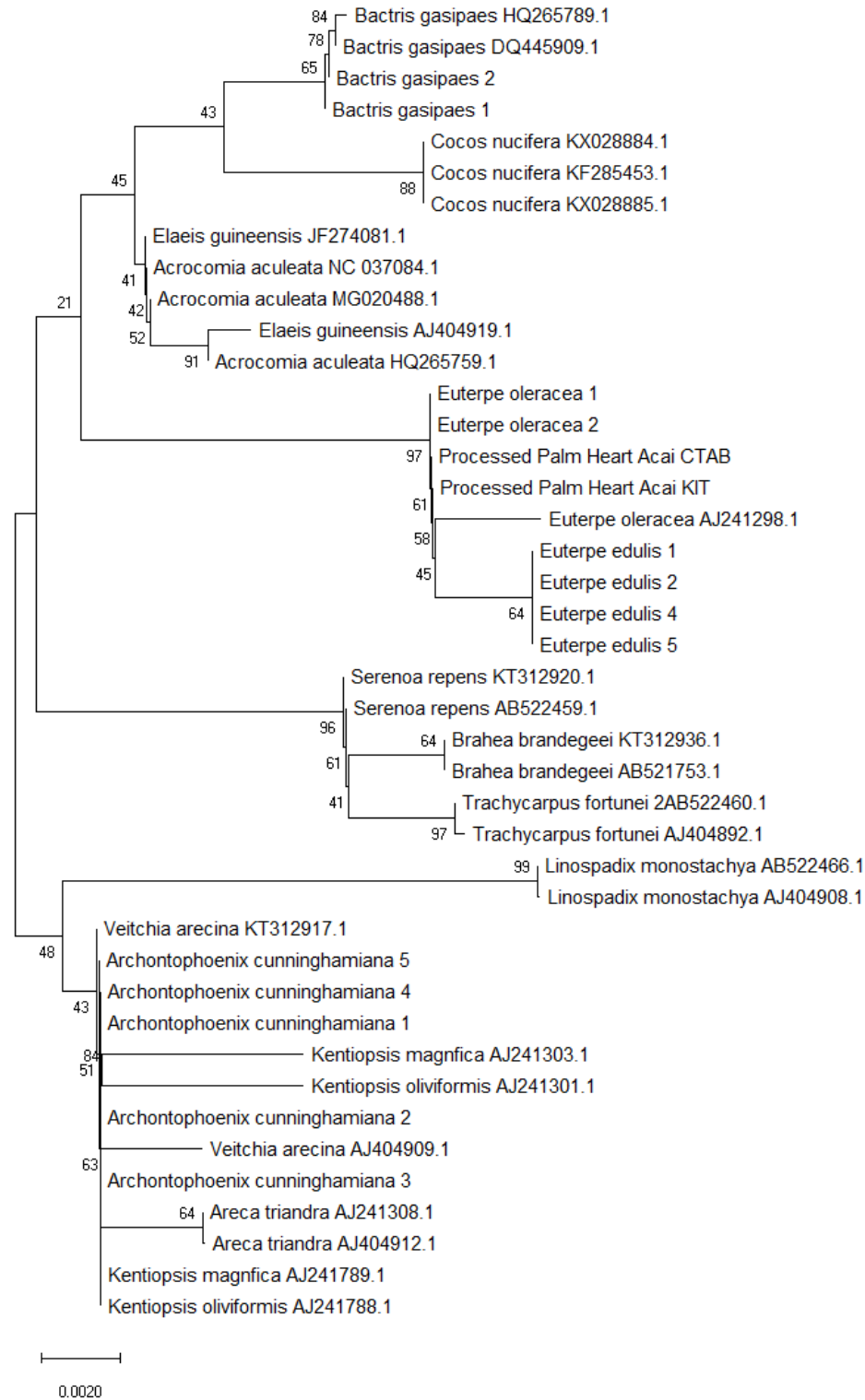
**Figure 3:** A taxon identification tree using the neighbor-joining (NJ) analysis of Kimura-2-parameter distances based on combined *trnL-trnF* + *rpl32-trnL* sequences. Bootstrap values are shown above the branches. Species names from Genbank are followed by accession numbers.



**Figure 4:** A taxon identification tree using the neighbor-joining (NJ) analysis of Kimura-2-parameter distances based on combined *rps16-trnK* + *trnL-trnF* + *rpl32-trnL* sequences. Bootstrap values are shown above the branches. Species names from Genbank are followed by accession numbers.



**Figure 5:** A taxon identification tree using the neighbor-joining (NJ) analysis of Kimura-2-parameter distances based on *trnL-trnF* in natura and palm heart sequences. Bootstrap values are shown above the branches. Species names from Genbank are followed by accession numbers.





### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS



Na segunda metade do século XIX, a ciência foi pela primeira vez empregada para a investigação de casos forenses e suas conclusões foram validadas pelas autoridades responsáveis. Com o avanço da tecnologia e do conhecimento acerca de diversas áreas da ciência, elas foram progressivamente incorporadas e adaptadas para a investigação de um crime (Código Penal - Decreto Lei 2848/40; Decreto Processual Penal). A perícia ambiental é o mecanismo usado para analisar informações e acontecimentos de atividades relacionadas a crimes ambientais, avaliando as condutas nocivas ao meio ambiente e se baseando em atividades e avaliações técnicas na busca do esclarecimento de fatos de maneira científica (Lei dos Crimes Ambientais 9.605 - 12 de fevereiro de 1998). A perícia tem evoluído muito no Brasil por conta do aprimoramento da legislação e maior rigidez nas leis no que diz respeito à conservação ambiental. Por conta da necessidade de controle das atividades humanas sobre os recursos naturais, os peritos se tornam parte fundamental do processo de construção de um país mais sustentável e protegido.

O presente estudo avaliou três possíveis regiões plastidiais (*rps16-trnK*, *trnL-trnF*, *rpl32-trnL*) e uma região nuclear (*ITS2*), já proposta por Kress *et al.* (2005), do DNA para o uso em investigações forense, como DNA *barcode*. Surpreendentemente, o marcador *rpl32-trnK* sozinho apresentou poder suficiente para a discriminação das espécies analisadas. Além disso, combinações das três regiões plastidiais (*rps16-trnK* + *rpl32-trnL*, *trnL-trnF* + *rpl32-trnL* e *rps16-trnK* + *trnL-trnF* + *rpl32-trnL*) também são fortes candidatos a *barcode*. O protocolo de CTAB com modificações se mostrou eficiente para a extração de DNA das amostras *in natura* das espécies *E. edulis*, *E. oleracea*, *B. gasipaes* e *A. cunninghamiana*; entretanto, para as amostras de palmito em conserva, se obteve sucesso apenas para *E. oleracea*. Esta dificuldade provavelmente está relacionada à baixa integridade do DNA nas amostras de palmito em conserva. Com o Dneasy Mericon Food Kit (QIAGEN) foi possível isolar o DNA de todas as quatro espécies desse estudo. Com o marcador *trnL-trnF* é possível perceber o agrupamento correto das amostras *in natura* e em conserva de Açaí. Para os demais marcadores, principalmente o *ITS2*, se faz necessário testes adicionais *in natura* e com DNA processado.

A metodologia desenvolvida neste trabalho para identificar estas espécies de palmeiras e seus palmitos, com elevada importância socioeconômica, vem se mostrando eficaz e fundamental para colaborar com a conservação das mesmas e também na segurança da origem do produto que chega ao consumidor. Ainda assim, algumas perspectivas complementares são previstas, como o uso de PCR *real time* associado com HRM (*High Resolution Melting*) e o teste de Wilcoxon. A PCR em tempo real é uma técnica derivada da PCR convencional, possuindo maior sensibilidade e conseqüentemente necessitando de quantidades mínimas de DNA inicial. Não requer manuseio de amostras pós-PCR, o que evita a potencial contaminação dos produtos da reação e resulta em ensaios mais rápidos e com maior rendimento. Devido à sensibilidade da reação é comumente utilizada para identificar alimentos (Heid *et al.*, 1996). Em palmitos, a PCR em

tempo real vem sendo utilizada para outros fins, como por exemplo: na determinação da expressão gênica da neurotoxina botulínica de *Cloristridium botulinum* tipo A (Oliveira, 2008) e detecção de *Trypanosoma cruzi* em polpa de açaí (*Euterpe oleracea*) (Vieira, 2015). Associada à técnica de PCR em tempo real, a técnica de HRM envolve elevar a temperatura do produto da PCR, enquanto o software mede a fluorescência da reação. À medida que a amostra é aquecida, o produto da PCR começa a desnaturar e há a diminuição da fluorescência e a formação da curva de *melting*. A temperatura de *melting* ( $T_m$ ) de um trecho do DNA depende da sua sequência de nucleotídeos e do tamanho em pares de base. A sensibilidade da técnica é alta e, mesmo com um curto produto de PCR, uma única mutação em um único nucleotídeo altera a  $T_m$  e isso permite a discriminação de dois ou mais genótipos ou alelos. Portanto, a forma da curva de *melting* pode ser uma excelente alternativa para ser utilizada com caráter diagnóstico (Vossen *et al.*, 2009; Wittwer, 2009). Para avaliar a significância da divergência intra e interespecífica também pode ser interessante o uso do teste de Wilcoxon, ou seja, o ponto de corte, a significância do *barcode gap*. Todas essas abordagens em conjunto podem contribuir para incrementar a utilização de barcodes na botânica forense.



#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alaeddini R, Walsh SJ, Abbas A (2010) Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA – a review, *Forensic Science International: Genetics* 4: 148–157.

Anderson A & Ioris EA (2001) A lógica do extrativismo: manejo de recursos e geração de renda por produtores extrativistas no estuário amazônico. In: Diegues, A.C.; Moreira, A. de C.A. (Eds.). *Espaços e recursos naturais de uso comum*. Nupaub-USP, São Paulo. p. 163-180.

Arzeni S & Jardim MAG (2004) Estratégias de sobrevivência em comunidades agroextrativistas de estuário amazônico. In: Jardim, M. A. G.; Mourão, L.; Grossman, M. *Açaí: Possibilidades e limites para o desenvolvimento sustentável no estuário amazônico*. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, p. 253-266.

Azevedo AML (2005) O Código de Barras da Vida baseado no DNA “Barcoding of Life”: Considerações e Perspectivas. *Cgee*.

Andreasen K (2005) Implications of molecular systematic analyses on the conservation of rare and threatened taxa: Contrasting examples from Malvaceae. *Conservation Genetics* 6:399-412.

Bakker FT, Culham A, Pankhurst CE, Gibby M (2000) Mitochondrial and chloroplast DNA-based phylogeny of *Pelargonium* (Geraniaceae). *American Journal of Botany* 87: 727-734.

Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277.

Balick MJ (1986a) The use of palms by the Apinayé and Guajajara Indians of Northeastern Brazil. In: Balick, M.J., ed. *The palm- tree of life: biology, utilization and conservation*. *Advances in Economical Botany*, New York, v.6, p.65-90.

Balick MJ (1986b) *The Palm - tree of life : biology utilization and conservation* New York. 282 p. il. (*Advances in Economic Botany*, 6). Proceedings of a Symposium at the 1986 annual meeting of the Society for Economic Botany held at the New York Botanical Garden, Bronx.

Balick MJ (1988) *The palm--Tree of life: Biology, utilization, and conservation: Proceedings of a symposium at the 1986 Annual Meeting of the Society for Economic Botany held at the New York Botanical Garden, Bronx, New York, 13-14 June 1986*. *Advances in Economic Botany* 6. New York Botanical Garden, Bronx.

Balslev H & Barfod A (1987) Ecuadorean palms: An overview. *Opera Bot.* 92: 17-35.

- Balslev H, Luteyn J, Ollgaard B, Holm-Nielsen LB (1987) Composition and structure of adjacent unflooded and floodplain forest in Amazonian Ecuador. *Opera Bot.* 92: 37-57.
- Bauer T, Weller P, Hammes WP, Hertel C (2003) The effect of processing parameters on DNA degradation in food, *European Food Research and Technology.* 217, 338–343.
- Beard JS (1944) Climax vegetation in tropical America. *Ecology* 25: 127-158.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Sayers EW (2011) GenBank, *Nucleic Acids Research* 39.D32–D37.
- Berbari SAG, Prati P, Junqueira VCA (2008) Qualidade do palmito da palmeira real em conserva. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* 28, Campinas: 135-141.
- Blattner FR (1999) Direct amplification of the entire ITS region from poorly preserved plant material using recombinant PCR, *Biotechniques* 27, 1180–1186.
- Bondar G (1964) *Palmeiras do Brasil*. Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo. 159p.
- Borchsenius F (1997) Palm communities in western Ecuador. *Principes* 41: 93-99.
- Borchsenius F, Pedersen HB, Balslev H (1998) *Manual to the palms of Ecuador*. AAU Reports. Dept. of Systematic Botany, University of Aarhus, Aarhus, Denmark.
- Bovi MLA (1998) Cultivo da palmeira Real Australiana visando à produção de palmito. Campinas: IAC. (Boletim técnico, n. 172).
- Bovi MLA (1997) Palmito Pupunha: Informações básicas para o cultivo. In: PASCHOALINO, J. E. et al. *Industrialização do palmito Pupunha*. Campinas: ITAL. Cap.1, p.1-14. (Manual Técnico, n. 15).
- Bovi MLA, Godoy Júnior G, Nagai V, Cardoso M (1990) Densidade de plantio de palmito em consórcio com seringueiras. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.25, n.7, p. 1023-1029.
- Bovi MLA, Resende MDV, Sáes LA, Uzzo RP (2004) Genetic analysis for sooty mold resistance and heart of palm yield in *Archontophoenix*. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 61, n. 2, p. 178-184.
- Braga R (1976) *Plantas do nordeste, especialmente do Ceará*. Mossoró: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 540p.

Brasil (2008) Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa n. 6, de 23 de setembro de 2008. ... espécies da flora brasileira ameaçada de extinção ... Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 24 set. 2008, Seção 01, p. 75-83.

Brown WM, George M, Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A. 76: 1967-1971.

Calzavara BBG (1972) As possibilidades do açazeiro no estuário amazônico. Belém: FCAP. 103p. (Boletim da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, 5).

Caputo M, Irisarri M, Alechine E, Corach D (2013) A DNA extraction method of small quantities of bone for high quality genotyping. Forensic Science International: Genetics 7: 488-493.

Carim MJV, Abdon LM, Guimarães JRS, Tostes LCL (2014) Análise estrutural de açazeiros nativos (*Euterpe oleraceae* Mart.) em Floresta de Várzea, Amapá, Brasil. Biota amazônica. Open journal system. Macapá, v.4, n.4, p. 45-51.

Carrier C, Cholette F, Quintero C, Fulcher C (2013) Potencial use of DNA barcoding for the identification of tobacco seized from waterpipes. Forensic Science International: Genetics 7, 194-197.

Cavalcante P (1991) Frutas comestíveis da Amazônia. Belém: CEJUP, 1991.271p.

CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants. PNAS 106 (31): 12794–12797.

Chapela MJ, Sotelo CG, Pérez-Martín RI, Pardo MA, Pérez-Villareal B, Gilardi P, Riese J (2007) Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. Food Control 18: 1211-1215.

Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell JM, Kesanakurthi RP, Haidar N, Savolainen V (2005) Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 360: 1889-1895.

Cho Y, Mower JP, Qiu YL, Palmer JD (2004) Mitochondrial substitution rates are extraordinarily elevated and variable in a genus of flowering plants. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A 101: 17741-17746.

Clement CR (1988) Domestication of the peijibaye palm (*Bactris gasipaes*): past and present, in The Palm - Tree of Life. Biology, Utilization and Conservation, Ed M.J. Balick (New York, NY: The New York Botanical Garden), 155–174.

- Clement CR (1992) Domesticated palms. *Principes*, Lawrence, v. 36, n. 2, p. 70-78.
- Coradin L, Siminski A, Reis A (2011) Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul – Brasília: MMA. 934p.
- Cowan RS, Chase MW, Kress WJ, Savolainen V (2006) 300,000 species to identify: problems, progress, and prospects in DNA barcoding of land plants. *Taxon* 55 (3): 611-616.
- D'Elboux R (2006) Uma promenade nos trópicos: os barões do café sob as palmeiras-imperiais, entre o Rio de Janeiro e São Paulo. *Anais Do Museu Paulista: História E Cultura Material*, 14(2), 193-250. <https://doi.org/10.1590/S0101-47142006000200007>.
- Dean W (1995) A ferro e fogo: a história da devastação da Mata Atlântica brasileira. Ed. Cia. Das Letras. São Paulo, SP, Brasil. 484 pp.
- Dick CW, Abdul-Salim K, Bermingham E (2003) Molecular systematic analysis reveals cryptic tertiary diversification of a widespread tropical rain forest tree. *American Naturalist* 162:691-703.
- Dong W, Xu C, Li C, Sun J, Zuo Y, Shi S, Cheng T, Guo J, Zhou S (2015) *ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plant. *Scientific Reports* 5: 8348.
- Dransfiel J (1978) Growth rates of rain forest palms. In: Tomlinson, P.B. and Zimmermann, M.H. (eds) *Tropical Trees as Living Systems*. Cambridge University Press, New York, pp. 247-268.
- Dransfield J, Uhl NW, Asmussen CB, Baker WJ, Harley MM, Lewis CE (2008) *Genera Palmarum: the evolution and classification of palms*. Kew Publishing, Royal Botanical Garden, Londres. 732p.
- Ebach MC & Holdrege C (2005) DNA barcoding is no substitute for taxonomy. *Nature* 434: 697-697.
- Ferreira VLP, Graner M, Bovi MLA, Draetta IS, Paschoalino JE, Shiroye I (1981/1982) Comparação entre os palmitos de *Guilielma gasipaes* Bailey (Pupunha) e *Euterpe Edulis* Mart. (Juçara). I – Avaliações físicas, organolépticas e bioquímicas. *Coletânea do ITAL*, n. 12, p. 255-272.
- Finkeldey R, Gailing O, Hattemer HH, Vornam B (2007) Molekulare Analyse von Pflanzenteilen in der Forensik, in: B. Herrmann, K. Saternus (Eds.), *Biologische Spurenkunde, Band 1 Kriminalbiologie*, Springer, Berlin/Heidelberg, pp. 343–362.
- Flora do Brasil 2020. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>

Flori JE, Resende GM, Drumond MA (2001) Rendimento do palmito de pupunha em função da densidade de plantio, diâmetro de corte e manejo dos perfilhos, no Vale do São Francisco. *Horticultura Brasileira*, v. 19, n. 2, p. 140-143.

Freitas FCL, Grossi JAS, Barros AF, Mesquita ER, Ferreira FA (2007) Controle de plantas daninhas na produção de mudas de plantas ornamentais. *Weed Control in Ornamental Plant Seedling Production. Planta Daninha*, Viçosa-MG, v.25, n. 3, p. 595-601.

Fundação Sos Mata Atlântica And INPE (1998) Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica no período de 1990–1995. São Paulo, Brasil. 55pp.

Galetti M & Aleixo A (1998) Effects of palm heart harvesting on avian frugivores in the Atlantic rain forest of Brazil. *Journal of Applied Ecology* 35: 286–293.

Goetze M, Palma-Silva C, Zanella CM, Bered F (2016) East-to-west genetic structure in populations of *Aechmea calyculata* (Bromeliaceae) from the southern Atlantic rainforest of Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society*, Volume 181, Issue 3, Pages 477–490.

Goetze M, Zanella CM, Palma-Silva C, Buttow MV, Bered F (2017) Incomplete lineage sorting and hybridization in the evolutionary history of closely related, endemic yellow-flowered *Aechmea* species of subgenus *Ortgiesia* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* 104 (7): 1073 – 1087.

Guerra MP, Nodari RO, Reis A (1984) Considerações sobre o palmiteiro no Sul do Brasil. *Ínsula* 14: 171–80.

Gregory TR (2005) DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature* 434: 1067-1067.

Hahn JW (2002) A molecular phylogenetic study of the Palmae (Arecaceae) based on *atpB*, *rbcL*, and 18S nrDNA sequences. *Systematic Biology* 51: 92-112.

Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003a) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London (Suppl.)* 270, S96–S99.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003b) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B* 270: 313–321.

Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004) Ten species in one: DNA Barcoding reveals cryptic species in neotropical skipper butterfly *Astrapes fulgerator*. *PNAS*, vol. 101, n. 41. 14812-14817.



- Henderson A & Galeano G (1996) *Euterpe, Prestoea, and Neonicholsonia* (Palmae: Euterpeinae). New York: New York Botanical Garden, 90p. (Flora Neotropica, 72).
- Henderson A, Galeano G, Bernal R (1995) Field guide to the palms of the Americas. Princeton University Press, New Jersey. 363p.
- Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP (2011) Choosing and using a plant DNA barcode. — PLoS ONE 6(5), e19254, doi:10.1371/journal.pone.0019254.
- Hummel S (2003) Ancient DNA Typing: Methods, Strategies and Applications, Springer, Heidelberg.
- Janzen DH (2005) Foreword. Pp. x-xii in: Krupnick, G. A. & Kress, W. J. (eds.), Plant Conservation: A Natural History Approach. Univ. Chicago Press, Chicago.
- Jeanson ML, Labat JN, Little DP (2011) DNA barcoding: a new tool for palm taxonomists? Annals of Botany 108: 1445-1451.
- Johnson D (1996) Palms: Their conservation and sustained utilization. Status survey and conservation action plan. IUCN, Gland, Switzerland.
- Johnson DV (1998) Non-wood forest products 10: tropical palms. [S.l.]. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/x0451e/x0451e00.HTM>>.
- Kahn F & Granville JJ (1992) Palms in forest ecosystems of Amazonia. Ecological Studies, 95. Springer-Verlag, Berlin.
- Karehed J & Bremer B (2008) The systematics of Knoxieae (Rubiaceae) – molecular data and their taxonomic consequences (vol 56, pag 1051, 2007). Taxon 57: 668-668.
- Klein RM (1979–1980) Ecologia da flora e vegetação do Vale do Itajaí. Sellowia 31/32: 9–389.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 102 (23): 8369–74.
- Kress WJ & Erickson DL (2007) A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding rbcL gene complements the noncoding trnH-psbA spacer region. PLoS One 2: e508.
- Kress WJ & Erickson DL (2008) DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. PNAS 105 (8): 2761–2762.

- Kulchetski L, Chaimsohn FP, Gardingo JR (2001) Palmito pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth): a espécie, cultura, manejo agrônômico, usos e processamento. Ponta Grossa: Editora UEPG, 148p.
- Lahaye RM, van der Bank M, Bogarin D, Warner J, et al. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U. S. A.* 105: 2923-2928.
- Lorenz JG, Jackson WE, Beck JC, Hanner R (2005) The problem and promise of DNA barcodes for species diagnosis of primate biomaterial. *Philosophical Transactions of the Royal Society B360*: 1869-1877.
- Lorenzi H, Noblick LR, Kahn F, Ferreira E (2010) Flora brasileira: Arecaceae (Palmeiras). Instituto Plantarum, Nova Odessa. Pp. 214-255.
- Mac Fadden J (2005) A produção de açaí a partir do processamento dos frutos do palmitero (*Euterpe edulis* Martius) na Mata Atlântica. 112 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.
- Macedo M (1995) Contribuição ao estudo de plantas econômicas no Estado de Mato Grosso. Cuiabá: UFMT. 70p.
- Martin-Bravo S, Meimberg H, Luceno M, Markl W, Valcarcel V, Brauchler C, Vargas P, Heubl G (2007) Molecular systematics and biogeography of Resedaceae based on ITS and trnL-F sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44:1105-1120.
- McNeill J & Turland NJ (2009) The systematics of Knoxieae (Rubiaceae) – molecular data and their taxonomic consequences (vol 56, pg 1051, 2007). *Taxon* 58:317-317.
- Mello JCT, Ribeiro ASD, Dias VHG, Silva R, Sabino BD, Garrido RG, Seldin Lra Neto RS (2015) A segment of rbcL gene as a potential tool for forensic discrimination of *Cannabis sativa* seized at Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Legal Medicine* 130 (2): 353-356.
- Meyer RS, DuVal AE, Jensen HR (2012) Patterns and processes in crop domestication: an historical review and quantitative analysis of 203 global food crops. *New Phytologist*. 196, 29–48. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04253.x
- Modolo VA (2017) Palmitos da flora brasileira. Acessado em: [abhorticultura.com.br](http://abhorticultura.com.br)
- Mora-Urpí J, Weber JC, Clement CR (1997) Peach palm. *Bactris gasipaes* Kunth. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 20. Rome: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research; Gatersleben: International Plant Genetic Resources Institute, 83 p.

Moreira DA & Nogueira OL (1994) Avaliação da produção de palmito de açaizeiro cultivado em terra firme. In: Congresso Brasileiro De Botânica. 45, São Leopoldo Anais. São Leopoldo: UNISINOS.

Moritz C (1995) Uses of molecular phylogenies for conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 349:113-118.

Moritz C & Cicero C (2004) DNA barcoding: promise and pitfalls. *Plos Biol.* 2: 1529-1531.

Moritz C, Dowling TE, Brown WM (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics.* 18: 269-292.

Mortara MO & Valeriano DM (2001) Modelagem da distribuição potencial do palmito (*Euterpe edulis* Martius) a partir de variáveis topográficas. In: Simpósio Brasileiro De Sensoriamento Remoto, 10., Foz do Iguaçu. Resumos... Foz do Iguaçu: INEPE, 2001. p.459-71.

Mower JP, Stefanovic S, Young GJ, Palmer JD (2004) Plant genetics: gene transfer from parasitic to host plants. *Nature* 432: 165-166.

Naeem A, Khan AA, Cheema HMN, Khan IA, Buerkert A (2014) DNA barcoding for species identification in the Palmae family. *Genetics and Molecular Research* 13 (4): 10341-10348.

Nagpal R, Dar TH, Raina SN (2008) Molecular systematics of Brassica and allied genera in subtribes Brassicinae, Raphaninae, Moricandiinae, and Cakilinae (Brassicaceae, tribe Brassiceae); the organization and evolution of ribosomal gene families. *Botanical Journal of the Linnean Society* 157:545-557.

Nascimento WMO (2008) Açaí *Euterpe oleracea* Mart. Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia Nº 18.

Nazaré RFR, Alves SM, Barbosa WC, Rodrigues IA, Faria LJG, Kusuhara K (1996) Estudos para identificação de vegetais produtores de corantes, ocorrentes na flora Amazônica. Geração de tecnologia agroindustrial para o desenvolvimento do trópico úmido. Belém: Embrapa-CPATU/JICA, p. 173-191.

Nazaré RFR & Ribeiro GJF (1998) Análise quantitativa dos teores de corantes em frutos de açaizeiro. Belém: Embrapa-CPATU, 18p. Embrapa-CPATU. Boletim de Pesquisa, 210).

Nesvadbová M, Knoll A, Vasatková A (2010) Selection of the most suitable method for the extraction of DNA from foods and feeds for species identification. *ACTA Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, Vol LVIII, 19 (2), 169-17.

- NevesEJM, Santos AF, Kalil FilhoNA, Martins EG (2002) Teores de nitrogênio, fósforo e potássio nas folhas de pupunha plantada no litoral do Estado do Paraná. Colombo: Embrapa Florestas. 3 p. (Comunicado Técnico 71).
- Newmaster SG, Fazekas AJ, Steeves RAD, Janovec J (2008) Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae. *Molecular Ecology Resources*. 8: 480-490.
- Nogueira OL, Galvão EUP, Oliveira RP, Moreira DA (2004) Relações entre caracteres fenotípicos quantitativos e produção de palmito de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) In: Jardim, M. A. G.; Mourão, L. Grossmann, M. (Ed.). Açai: possibilidades e limites para o desenvolvimento sustentável no estuário amazônico. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, p. 27 – 36. (Coleção Adolpho Ducke).
- Oliveira MSP (1995) Avaliação do modo de reprodução e de caracteres quantitativos em 20 acessos de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart. – Arecaceae) em Belém-PA. Recife: UFRPE, 145p. (Tese de Mestrado).
- Oliveira MSP, Carvalho JEU, Nascimento WMO (2000) AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) Embrapa.
- Palmer JD, Adams KL, Cho Y, Parkinson CL, Qiu YL, Song K (2000) Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: Mobile genes and introns and highly variable mutation rates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. U.S.A 97: 6960-6966.
- Parkinson PL, Mower JP, Qiu YL, Shirk AJ, Song K, Young ND, dePamphilis CW, Palmer JD (2005) Multiple major increases and decreases in mitochondrial substitution rates in the plant family Geraniaceae. *BMC Evolutionary Biology* 5: 73.
- Peano C, Samson MC, Palmieri L, Gulli M, Marmioli N (2004) Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and Non-GMO Foodstuffs with four different extraction methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6962– 6968.
- Peres CA (1994) Composition, density, and fruiting phenology of arborescent palms in an Amazonian terra firme forest. *Biotropica* 26: 285-294.
- Peterson A, Levichev IG, Peterson J (2008) Systematics of *Gagea* and *Lloydia* (Liliaceae) and infrageneric classification of *Gagea* based on molecular and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46:446-465.
- Piggott MP, Taylor AC (2003) Remote collection of animal DNA and its applications in conservation management and understanding the population biology of rare and cryptic species, *European Journal of Wildlife Research* 30, 1–13.

- Pollak H, Mattos M, Uhl C (1996) O perfil da extração de palmito no estuário amazônico. Belém: IMAZON, 41p.
- Queiroz JAL & Mochiutti S (2001) Guia prático de manejo de açazais para produção de frutos. Macapá: Embrapa Amapá, 24p. (Embrapa Amapá. Documento, 26).
- Rachmayanti Y, Leinmann L, Gailing O, Finkeldey R (2009) DNA from processed and unprocessed Wood: Factors influencing the isolation success. Forensic Science International: Genetics 3, 185-192.
- Ratnasingham S & Hebert PDN (2007) BOLD: the barcode of life data system (<http://www.barcodinglife.org>), Molecular Ecology Notes 7, 355–364.
- Reis A (1993) Manejo e conservação das florestas catarinenses. Professor titular thesis, UFSC, Florianópolis, Brasil. 137 pp.
- Reis MS (1995) Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmito (*Euterpe edulis* Martius). Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- Reis MS, Fantini AC, Nodari RO, Reis A, Guerra MP, Mantovani A (2000) Management and conservation of natural populations in Atlantic rain Forest: the case study of palm heart (*Euterpe edulis* Martius). Biotropica 32(4b), p.849-902.
- Reis MS & Guerra MP (1999) *Euterpe edulis* Martius (Palmito). Florianópolis: Projeto "Inventário dos Recursos florestais da Mata Atlântica". Disponível em <http://www.unicamp.br/nipe/rbma/pamilto.htm>.
- Reitz R (1974) Palmeiras. In: Reitz, R. (ed.). Flora ilustrada catarinense. Itajaí, SC: Herbário Barbosa Rodrigues (HBR). 189p.
- Reitz R, Klein RM, Reis A (1978) Projeto madeira de Santa Catarina. SUDESUL- Governo do Estado de Santa Catarina, IBDF, Itajaí, Brasil. 320 pp.
- Roosevelt AC, Costa ML, Machado CL, Michab M, Mercier N, Valladas H, Feathers J, Barnett W, Silveria MI, Henderson A, Sliva J, Chernoff B, Reese DS, Holman JA, Toth N, Schick K (1996). Paleoindian cave dwellers in the Amazon: The peopling of the Americas. Science 272: 373-384.
- Roosmalen MGM van (1985) Fruits of the Guianan Flora. Utrecht: Institute of Systematics Botany/Wageningen Agricultural University, 483p.

Santos AF, Neves EJM, Kalil Filho NA, Tessmann DJ, Durigan ME, Corrêa Júnior C (2003) Projeto Palmito de Pupunha: uma alternativa sustentável para o aproveitamento de áreas abandonadas pela agricultura no Domínio da Mata Atlântica.(Embrapa Florestas. Documentos, 88).

Schindel DE & Miller SE (2005) DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature* 435: 17-17.

Sedra M, El Filali H, Frira D (1993) Observations sur quelques caractéristiques phénotypiques et agronomiques du fruit des variétés et clones du palmier dattier sélectionnés. *Al Awamia* 82: 105-120.

Seethapathy GS, Ganesh A, Kumar JUS, Senthilkumar U, Newmaster SG, Ragupathy S, Shaanker RU, Ravikanth G (2015) Assessing product adulteration in natural health products for laxative yielding plants, *Cassia*, *Senna* and *Chamaecrista*, in Southern India using DNA barcoding. *International Journal of Legal Medicine* 129: 693-700.

Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE, Small RL (2005) The tortoise and the hare II: Comparison of the relative utility of 21 non-coding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*. 92: 142-166.

Simonian LTL (2004) Devastação e impasses para a sustentabilidade dos açazais no Vale do Rio Maracá, AP. In: Jardim, M.A.G.; Mourão, L.; Grossman, M. Açai: possibilidade e limites para o desenvolvimento sustentável no estuário amazônico. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, p. 233-254.

Soares KP, Longhi SJ, Witeck Neto L, de Assis LC (2014) Palmeiras (Arecaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Rodriguésia* 65 (1): 113-139.

Soares LE, Goetze M, Zanella CM, Bered F (2018) Genetic diversity and population structure of *Vriesea reitzii* (Bromeliaceae), a species from the Southern Brazilian Highlands. *Genetics and Molecular Biology* vol.41 (1) <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0062>.

Sobral M, Jarenkow JÁ, Brack P, Irgang B, Larocca J, Rodrigues RS (2006) Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil. São Carlos: RiMa: Novo Ambiente. 350p.

Soltis ED & Soltis OS (2000) Contributions of plant molecular systematics to studies of molecular evolution. *Plant Molecular Biology* 42:45-75.

Soltis OS & Gitzendanner MA (1999) Molecular systematics and the conservation of rare species. *Conservation Biology* 13:471-483.

Svenning JC & Balslev H (1998). The palm flora of the Maquipucuna montane forest reserve, Ecuador. *Principes* 42: 218-226.

Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH, Vogler AP (2002) DNA points the way ahead in taxonomy - in assessing new approaches, it's time for DNA's unique contribution to take a central role. *Nature* 418: 479.

Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH, Vogler AP (2003) A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution* 18: 70-74.

Terborgh J, Foster RB, Nunez PV (1996) Tropical tree communities: A test of the non equilibrium hypothesis. *Ecology* 77: 561-567.

Uhl NW & Dransfield J (1987) *Genera palmarum: A classification of palms based on the work of Harold E. Moore, Jr.* L. H. Bailey Hortorium; International Palm Society, Lawrence, KS.

Wing SL, Hickey LJ, Swisher CC (1993) Implications of an exceptional fossil flora for Late Cretaceous vegetation. *Nature* 363: 342-344.

Wong EHK & Hanner RH (2008) DNA barcoding detects market substitution in North American seafood, *Food Research International*. 41. 828–837.

Yang HQ, Dong YR, Gu ZJ, Liang N, Yang JB (2012) A preliminary assessment of matK, rbcL and trnH-psbA as DNA barcodes for *Calamus* (Arecaceae) species in China with a note on ITS. *Annales Botanici Fennici*, 49 (5): 319-330.

Zambrana NYP, Byg A, Svenning CC, Moraes M, Grandez C, Balslev H (2007) Diversity of palm uses in the western Amazon. *Biodiversity and Conservation* 16: 2771-2787.

Zanella CM, Palma-Silva C, Goetze M, Bered F (2016) Hybridization between two sister species of Bromeliaceae: *Vriesea carinata* and *V. incurvata*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, Volume 181, Issue 3, Pages 491–504.

Zhang AB, He LJ, Crozier RH, Muster C, Zhu CD (2010) Estimating sample sizes for DNA barcoding. Elsevier. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 1035-1039.