



**UFAM**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FLORESTAIS E AMBIENTAIS - PPGCIFA

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE  
CASTANHEIRA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H. B. K.)**

**LUCYANNA MOURA COELHO**

Manaus - Amazonas  
Setembro - 2013

**LUCYANNA MOURA COELHO**

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE  
CASTANHEIRA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H. B. K.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Ciências Florestais e Ambientais da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Florestais e Ambientais.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>: Maria Teresa Gomes Lopes

Coorientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup>: Pedro de Queiroz Costa Neto

Manaus - Amazonas  
Setembro – 2013



Poder Executivo  
Ministério da Educação  
Universidade Federal do Amazonas  
Faculdade de Ciências Agrárias  
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Florestais e Ambientais - PPGCIFA



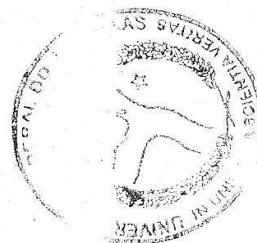
**PARECER**  
Defesa nº 137

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais, da Faculdade de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Amazonas, após arguir da mestranda **LUCYANNA MOURA COELHO**, em relação ao seu trabalho de dissertação intitulado "**DIVERSIDADE GENÉTICA DE CASTANHA-DO-BRASIL** (*Bertholletia excelsa* H.B.K)", é de parecer favorável à aprovação da mestranda habilitanda ao título de Mestre "*Magister Scientiae*" em Ciências Florestais e Ambientais, na área de concentração em **CIÊNCIAS FLORESTAIS E AMBIENTAIS (CIFA)**.

Doutora Maria Teresa Gomes Lopes  
Professora da Faculdade de Ciências Agrária da Universidade Federal do Amazonas  
Presidente da banca examinadora

Doutor Pedro de Queiroz Costa Neto  
Professor da Faculdade de Ciências Agrária da Universidade Federal do Amazonas  
Segundo examinador

Doutora Nádia Verçosa de Medeiros Raposo  
Professora da Universidade Estadual do Amazonas  
Primeiro examinador



Manaus, 02 de setembro de 2013.

Prof. Dr. Julio César Rodríguez Tello  
Coordenador do Programa de Pós Graduação em  
Ciências Florestais e Ambientais – PPG-CIFA

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| C672d | <p>Coelho, Lucyanna Moura<br/>Diversidade genética em populações de castanheira-do-Brasil<br/>(<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.) / Lucyanna Moura Coelho. - Manaus: UFAM, 2013.<br/>56 f. : il. color.<br/>Dissertação (Mestre em Ciências Florestais e Ambientais) —<br/>Universidade Federal do Amazonas.<br/>Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Teresa Gomes Lopes.<br/>Co-orientador: Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto.</p> <p>1. Lecitidácea 2. Plantas – Variação 3. Genética vegetal 4. Castanheira-do-Brasil I. Lopes, Maria Teresa Gomes (Orient.) II. Costa Neto, Pedro de Queiroz (Orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título</p> <p>CDU (2007): 582.687.66-116.9(043.3)</p> |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

*Aos meus pais, à minha família em  
especial ao meu esposo e a todos  
meus amigos que contribuíram direta  
e indiretamente para a realização  
desse projeto.*

*Dedico.*

“Do meu telescópio, eu via Deus caminhar! A maravilha, a harmonia e a organização do universo só pode ter se efetuado conforme um plano de um Ser todo-poderoso e onisciente”.

Isaac Newton

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente a Deus, por me amar infinitamente. Sem Ele não sou nada.*

*À Universidade Federal do Amazonas.*

*À Capes pelo apoio financeiro.*

*Aos meus orientadores Dra. Maria Teresa Gomes Lopes e Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto por acreditarem em mim, pela orientação, pelo apoio e contribuição para a realização deste trabalho.*

*A Prof<sup>te</sup> Dra. Nádia Mestrinho pelo incentivo e apoio às pesquisas voltadas para a castanheira-do-Brasil assim como a apresentação à espécie.*

*Ao Dr. Gabriel da Fazenda Aruanã e ao Diretor do Instituto Federal do Amazonas – Zona Leste por permitirem a minha entrada para coleta de material vegetal e a meu cunhado Paulo pela ajuda na coleta em Parintins.*

*Aos colegas dos Laboratórios de Genética, de Evolução Aplicada, de Microbiologia e de Melhoramento Vegetal da UFAM: João, Ydrielly, Tiara, Alana, Poliana, Ayra, Liane, Catiele, Liliane, Lúcia pela força e ajuda nos momentos críticos e também a todos os estagiários que passaram por esses laboratórios pelas contribuições, mínimas que fossem.*

*À Profª Dra. Doriane Picanço, coordenadora do Laboratório de Evolução Aplicada – LEA, pelas ricas sugestões, pela dedicação ao ensinar-me a extração de DNA e por estar sempre disposta a ajudar.*

*Aos colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação de Ciências Florestais e Ambientais, Luciana, Vanessa, Tom e Sueny, que de formas diferenciadas colaboraram com a execução desse projeto. Em especial à Keith e Benone pela ajuda na leitura dos géis e ao colega Amazonino pela ajuda na construção do mapa de localização das coletas.*

*Às minhas amigas e ex-colegas do Laboratório da Universidade Estadual do Amazonas, Lyana e Ana e meu primo Dr. Leonardo Brandão por me ensinarem as estratégias de manipulação de equipamentos e reagentes no laboratório.*

*À minha amiga e irmã de coração Magna Aragão Magalhães pelo total companheirismo, por ter estado sempre ao meu lado nos momentos dos quais compartilhamos muitas alegrias e também muitas dificuldades no decorrer deste projeto.*

*Eternos agradecimentos à minha família querida e abençoada por Deus, a qual é meu alicerce do dia-a-dia para o que der e vier. Ao meu esposo João e aos meus filhos Victor e Lunna pelo carinho e amor incondicional expressado em cada fase desse projeto, sempre me incentivando.*

**AGRADEÇO**

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** *Bertholletia exelsa*. A) Flores; B) Fruto (Ouriço); C) Fuste; D) Folhas e Inflorescência; E) Madeira. F) Sementes (Amêndoas)

**Figura 2.** Flor de castanheira-do-Brasil em cultivo no Município de Itacoatiara-AM. A) Corte transversal da flor, após antese; B) Partes reprodutivas da flor após abertura manual da lígula

**Figura 3.** A e B) Abelhas tentando penetrar nas flores de castanheira-do-Brasil em cultivo, no Município de Itacoatiara-AM; C e D) Borboletas coletando néctar nas flores de castanheira-do-Brasil em cultivo, no Município de Itacoatiara-AM

**Figura 4.** Mapa de localização de castanheira-do-Brasil

**Figura 5.** Mapa de localização das áreas de coleta

**Figura 6.** Quantificação de DNA de 23 indivíduos de castanheira-do-Brasil em gel de agarose 0,8%. Em M encontra-se o marcador com concentrações de 20 e 50 ng/μL

**Figura 7.** Dendrograma de dados binários de AFLP baseado no coeficiente de Jaccard para a população de Aruanã Carolina de castanheira-do-Brasil pelo método UPGMA; Os valores nos agrupamentos são os resultados mais elevados do *bootstrap* (5.000 simulações); G1, G2 e G3 são os agrupamentos formados de acordo com o ponto de corte

**Figura 8.** Dendrograma de dados binários de AFLP baseado no coeficiente de Jaccard para a população de Aruanã Brastor de castanheira-do-Brasil pelo método UPGMA; Os valores nos agrupamentos são os resultados mais elevados do *bootstrap* (5.000 simulações); G1, G2, G3 e G4 são os agrupamentos formados de acordo com o ponto de corte

**Figura 9.** Dendrograma de dados binários de AFLP baseado no coeficiente de Jaccard para a população de Manaus IFAM de castanheira-do-Brasil pelo método UPGMA; Os valores nos agrupamentos são os resultados mais elevados do *bootstrap* (5.000 simulações); G1, G2, G3 e G4 são os agrupamentos formados de acordo com o ponto de corte

**Figura 10.** Dendrograma de dados binários de AFLP baseado no coeficiente de Jaccard para a população de Parintins de castanheira-do-Brasil pelo método UPGMA; O valor no agrupamento é o resultado mais elevado do *bootstrap* (5.000 simulações); G1, G2, G3, G4, G5 e G6 são os agrupamentos formados de acordo com o ponto de corte

**Figura 11.** Dendrograma de dados binários de AFLP baseado no coeficiente de Jaccard para a população de Manaus Aeroporto de castanheira-do-Brasil pelo método UPGMA; Os valores nos agrupamentos são os resultados mais elevados do *bootstrap* (5.000 simulações); G1, G2, G3 e G4 são os agrupamentos formados de acordo com o ponto de corte

**Figura 12.** Dendrograma de UPGMA interpopulacional de castanheira-do-Brasil, onde: AC = Aruanã Carolina; AB = Aruanã Brastor; MI = Manaus IFAM; MA = Manaus Aeroporto, calculado de acordo com o coeficiente de Nei. As partes hachuradas representa a divisão dos grupos

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Locais de coleta e coordenadas geográficas

**Tabela 2.** Sítios de restrição, sequências de adaptadores e de oligonucleotídeos usados para as análises de AFLP

**Tabela 3.** Lista de combinação de oligonucleotídeos e número de *locos* polimórficos para cada população de castanheira-do-Brasil

**Tabela 4.** Matriz de distância genética de Nei para as cinco populações de castanheira-do-Brasil

**Tabela 5.** Resultado da análise de variância molecular (AMOVA) para as cinco populações

**Tabela 6.** Resultado da análise de variância molecular (AMOVA) para as populações cultivadas (Aruanã Carolina, Aruanã Brastor e Manaus IFAM)

**Tabela 7.** Resultado da análise de variância molecular (AMOVA) para as populações naturais (Parintins e Manaus Aeroporto)

## RESUMO

A castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) é uma das árvores-símbolo da Amazônia, apresentando um grande valor social, ecológico e econômico para a região. Nos quatro primeiros meses de 2012, o volume total das exportações de castanha-do-Brasil atingiu 4.940 toneladas, gerando uma receita de U\$S 6,5 milhões, valor 65,6% superior ao observado no mesmo período de 2011. A coleta excessiva em castanhais nas florestas tem se intensificado e compromete o futuro da espécie. A diversidade genética dentro de uma espécie facilita a adaptação evolutiva em decorrência das mudanças ambientais e precisa ser preservada para que sua perpetuação ocorra. O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade e genética entre e dentro de populações de castanheira-do-Brasil por meio de marcadores moleculares AFLP. Foram avaliadas cinco populações no Estado do Amazonas com 30 indivíduos cada, duas populações da Fazenda Aruanã (Aruanã Carolina e Aruanã Brastor), uma de Parintins e duas de Manaus (Manaus IFAM e Manaus Aeroporto). A extração de DNA foi realizada pelo método CTAB, baseado no protocolo de Doyle e Doyle (1987), com adaptações. Foram utilizados quatro combinações de oligonucleotídeos (E+ATC/M+CCA; E+AGC/M+CAT; E+AGC/M+CCA; E+ACA/M+CAC) na genotipagem dos 150 indivíduos e obtidas 306 bandas polimórficas (93,3%). A diferenciação genética dentro e entre populações foi testada pela análise de variância molecular (AMOVA) utilizando o programa Genes. As distâncias genéticas de Jaccard foram utilizadas em uma análise de agrupamento do tipo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method by Arithmetic Averages) e o teste de bootstrap foi realizado com 5.000 reamostragens. Os resultados indicaram que a presença de divergência genética é maior dentro de populações (51,88%) do que entre populações (48,11%). O valor de  $F_{st}$  foi igual a 0,48. Dois grupos foram formados no agrupamento interpopulacional: o primeiro constituiu-se de populações oriundas de plantios, Aruanã Carolina, Aruanã Brastor e Manaus IFAM e o segundo de populações naturais, Parintins e Manaus Aeroporto. Os marcadores AFLP foram eficientes na caracterização de populações naturais e cultivadas de castanheira-do-Brasil.

**Palavras-chave:** Variação genética, marcador molecular, Lecythidacea.

## ABSTRACT

The Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) is a symbol tree of the Amazon, which provides a great social, ecological and economic development for the region. In the first four months of 2012, total exports of Brazil nuts reached 4,940 tons, generating revenues of US\$ 6.5 million, a figure 65.6% higher than in the same period of 2011. Despite high values of production and export of Brazil Nuts, and the extreme importance it has in the economy, studies show that excessive collection in forests jeopardizes the future of the species. It is through the genetic diversity that species are maintained over time, allowing the evolutionary adaptation of the species as a result of environmental changes. The objective of this work was to study the genetic diversity among and within populations of Brazil nuts by AFLP markers. One hundred and fifty subjects were evaluated, two populations from Aruanã Farm, one from Parintins and two from Manaus. The DNA of these individuals was extracted by CTAB method, based on the protocol of Doyle and Doyle (1987), with some adaptations and quantified. In analyzes, we used four primer combinations (E + ATC / M + CCA + E AGC / M + CAT, E + AGC / M + CCA E + ACA / M + CAC) that generated 306 polymorphic bands (93.3%). Genetic differentiation within and among populations was tested by analysis of molecular variance (AMOVA), using the Genes software (Cruz, 2006a). The genetic distances of Jaccard were used in a cluster analysis of UPGMA type (Unweighted Pair-Group Method by Arithmetic Averages), using the Genes program, and *bootstrap* test was conducted with 5,000 permutations. Results indicated that the presence of genetic divergence is greater within populations (51.88%) than among populations (48.11%). The  $F_{st}$  value was equal to 0.48. Two groups were formed in interpopulational grouping: the first consisted of individuals from Aruanã Carolina, Aruanã Brastor and Manaus IFAM (planted), and the second presented individuals from Parintins and Manaus Airport (natural). AFLP markers were efficient in the characterization of natural populations and cultured Brazil nuts.

**Key words:** Genetic variability, molecular marker, Lecythidacea.

## SUMÁRIO

|                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                      | <b>01</b> |
| <b>2 OBJETIVOS .....</b>                                                       | <b>03</b> |
| <b>2.1 Geral .....</b>                                                         | <b>03</b> |
| <b>2.2 Específicos .....</b>                                                   | <b>03</b> |
| <b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                                           | <b>04</b> |
| <b>3.1 <i>Bertholletia excelsa</i> .....</b>                                   | <b>04</b> |
| 3.1.1 Classificação Taxonômica .....                                           | 05        |
| 3.1.2 Características Botânicas .....                                          | 07        |
| 3.1.3 Estrutura Populacional .....                                             | 09        |
| 3.1.4 Utilização .....                                                         | 10        |
| 3.1.5 Ocorrência Natural e Distribuição Geográfica .....                       | 11        |
| 3.1.6 Importância Nutricional .....                                            | 12        |
| 3.1.7 Importância Econômica .....                                              | 13        |
| <b>3.2 Diversidade Genética .....</b>                                          | <b>14</b> |
| 3.2.1 Marcadores Moleculares .....                                             | 15        |
| 3.2.2 AFLP .....                                                               | 16        |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                              | <b>17</b> |
| <b>4.1 Coleta do Material Vegetal .....</b>                                    | <b>17</b> |
| <b>4.2 Caracterização das Áreas de Estudo .....</b>                            | <b>18</b> |
| 4.2.1 Fazenda Aruanã .....                                                     | 18        |
| 4.2.2 Parintins .....                                                          | 19        |
| 4.2.3 Manaus IFAM - Instituto Federal do Amazonas – Centro Manaus Zona Leste.. | 19        |
| 4.2.4 Manaus Aeroporto .....                                                   | 19        |
| <b>4.3 Extração e Quantificação do DNA .....</b>                               | <b>19</b> |
| <b>4.4 Desenvolvimento de marcadores AFLP .....</b>                            | <b>21</b> |
| 4.4.1 Restrição do DNA .....                                                   | 21        |
| 4.4.2 Preparo dos adaptadores .....                                            | 21        |
| 4.4.3 Ligação dos adaptadores .....                                            | 22        |
| 4.4.4 Reações de amplificação .....                                            | 22        |
| <b>4.5 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida .....</b>                         | <b>24</b> |

|                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.6 Revelação do Gel .....</b>                                      | <b>25</b> |
| <b>4.7 Análises Estatísticas de Marcadores AFLP .....</b>              | <b>26</b> |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                  | <b>28</b> |
| <b>5.1 Extração e Quantificação de DNA .....</b>                       | <b>28</b> |
| <b>5.2 Seleção de oligonucleotídeos .....</b>                          | <b>29</b> |
| <b>5.3 Níveis de Polimorfismos detectados pelo marcador AFLP .....</b> | <b>29</b> |
| <b>5.4 Análise dos Dendogramas .....</b>                               | <b>31</b> |
| 5.4.1 Dentro de Populações (Intrapopulacional) .....                   | 31        |
| 5.4.2 Entre Populações (Interpopulacional) .....                       | 36        |
| <b>5.5 Diversidade Genética Entre e Dentro das Populações .....</b>    | <b>39</b> |
| <b>6 CONCLUSÕES .....</b>                                              | <b>44</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                               | <b>45</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>                                                    | <b>52</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), espécie arbórea pertencente à família Lecythidaceae, é uma das árvores-símbolo da Amazônia, apresentando valor social, ecológico e econômico para a região, já que seus frutos (ouríços) e sua madeira são intensamente comercializados (BORÉM et al., 2009).

A amêndoa é um dos produtos não madeireiros mais importantes da economia florestal da Amazônia em termos comerciais na região Norte do Brasil, perdendo somente para o açaí (*Euterpe* sp.). Em 2011, o Amazonas foi o principal produtor do país com 14,6 mil toneladas seguido pelo Estado do Acre com 14 mil. No caso das exportações, destacou-se como principal destino a Bolívia com o produto *in natura*, seguido dos Estados Unidos, incluindo castanha beneficiada, Hong Kong, Europa e Austrália. Nos quatro primeiros meses de 2012, o volume total das exportações de amêndoas da castanheira-do-Brasil atingiu 4.940 toneladas, gerando uma receita de US\$ 6,5 milhões, valor 65,6% superior ao observado no mesmo período de 2011 (CONAB, 2012).

Apesar dos altos valores de produção e exportação da castanha-do-Brasil e da extrema importância que a mesma tem na economia do país, estudos da revista científica *Science* destacou ameaças à castanheira-do-Brasil, como a coleta excessiva nas florestas que geram poucas novas árvores e comprometem o futuro da espécie e que as plantas originárias de viveiros ou sementes germinadas a partir do processo natural de dispersão demorariam várias décadas até que pudessem substituir árvores que hoje são velhas e que caracterizam os castanhais persistentes explorados (SHEPARD e RAMIREZ, 2011).

A coleta de suas amêndoas foi tão intensa no último século que a reposição das árvores mais antigas pelas jovens não ocorre mais no ritmo desejado, dificultando a sucessão das gerações de castanheiras. Esse fenômeno é conhecido como colapso demográfico, ou seja, quando a maioria dos indivíduos de uma população (de plantas ou animais) é velha e não gera mais descendentes. Se o número de jovens diminui de modo constante, a espécie tende a desaparecer pouco a pouco, ao menos na região que ocupa (PERES et al., 2003).

Possíveis consequências da exploração desordenada das espécies das florestas tropicais são alterações no seu comportamento dentro das populações, como: alteração do tamanho populacional, dos padrões espaciais e no comportamento dos polinizadores, afetando de forma negativa a estrutura genética de suas populações, podendo levar, por exemplo, à perda de alelos raros, à redução na heterozigosidade e na taxa de cruzamento, ao aumento da endogamia intrapopulacional e divergência entre populações. Estas alterações podem causar redução na aptidão e na adaptação das gerações futuras, devido à erosão genética, colocando em risco a produção contínua e sustentada deste produto florestal e a conservação e manutenção da espécie assim como dos ecossistemas que a abrangem (GUSSON, 2003).

A diversidade genética é o meio pelo qual as espécies se mantêm ao longo do tempo permitindo a adaptação evolutiva das espécies em decorrência das mudanças ambientais. Esse conhecimento nas populações é fundamental para a aplicação de técnicas de manejo nas florestas e para o estabelecimento de ações de conservação *ex situ*, *in situ* e *on farm* (MÜLLER e VIEIRA, 2010).

O conhecimento da distribuição da diversidade genética dentro e entre populações de castanheira-do-Brasil subsidiará a implementação de planos de uso e conservação dos recursos genéticos da espécie. Como ferramenta neste processo, os marcadores moleculares permitem gerar grande quantidade de informações sobre a identidade genética, a diversidade, a frequência gênica e os relacionamentos filogenéticos dos recursos genéticos (SUJII et al., 2008).

Muitas são as técnicas para estudo de diversidade genética envolvendo marcadores moleculares, entre elas destaca-se a técnica AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados), a qual foi realizada neste trabalho, pois detecta um maior número de *locos* e o fato de não haver necessidade do conhecimento prévio de dados de sequência de DNA para a construção dos oligonucleotídeos utilizados (LOPES et al., 2002).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Estudar a diversidade genética entre e dentro de populações de castanheira-do-Brasil por meio de marcadores moleculares AFLP.

### **2.2 Específicos**

Otimizar protocolo de extração de DNA de castanheira-do-Brasil;

Caracterizar a diversidade genética existente entre e dentro de populações naturais e cultivadas de castanheira-do-Brasil utilizando marcadores moleculares AFLP.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *Bertholletia excelsa* H.B.K.

A castanheira-do-Brasil é uma árvore nativa da região Amazônica e apresenta divisão botânica a partir da seguinte classificação: é uma Angiosperma, da classe Dicotyledonea, da ordem Myrtiliflorae, pertencente à família das Lecythidaceae, gênero *Bertholletia*, espécie *excelsa* (YANG, 2009).

Originária do Brasil, a Castanheira-do-Brasil foi descrita em 1808 pelos pesquisadores Humboldt, Bonpland e Kunt em homenagem, em latim, ao nome do químico francês Claude Louis Berthollet (1748-1822), um clássico dos tempos de Napoleão muito admirado na época em que a árvore foi batizada (século XIX). A designação da espécie, que serve como adjetivo qualifica-a de excelente. A tradução desse nome do latim seria então, “a excelente de Berthollet” (MORI e PRANCE, 1990).

Poiteau, em 1825, foi o primeiro a classificar a Lecythidaceae como família, removendo os gêneros *Bertholletia*, *Couratari*, *Couroupita* e *Gustavia* da família Myrtaceae, na qual eram tradicionalmente classificados. A espécie *bertholletia excelsa* é considerada como sendo a única do gênero (MORI e PRANCE, 1990).

Os extrativistas do Sudeste do Estado do Acre relataram a existência de dois tipos de castanheira-do-Brasil: as vermelhas e as brancas. A primeira apresenta tronco mais grosso, copa no formato de guarda-chuva, madeira vermelha e maior número de frutos. Possui maior produtividade e suas amêndoas são maiores e mais oleaginosas. Sua madeira é preferida pelos madeireiros por apresentar boa resistência à degradação quando exposta ao sol, sendo destinada à construção civil. Já a segunda apresenta copa menor e se forma a partir de uma bifurcação bem característica denominada pelos extrativistas de “copa para cima” ou “gancho de baladeira”. O seu tronco é mais fino sendo observado um afunilamento da base para a copa. A madeira, segundo os castanheiros, não apresenta valor comercial, pois se decompõe facilmente (BRAGA, 2007). Um estudo visando diferenciar os dois tipos foi realizado por meio de análises com marcadores moleculares RAPD e ISSR e os resultados preliminares não demonstraram diferenças genotípicas entre a Castanheira-do-Brasil vermelha e a branca (SUJII et al., 2008).

*Bertholletia excelsa* tem vários nomes populares: castanheira, castanha-do-Brasil, eraí (índios Caruchis), iniá (índios Chipayas) e to Cary (índios Parecis) (LOUREIRO, 1979); Brazil nut, Pará nut (inglês), noix du Brésil, noix de Pará, chatâigne du Brésil (francês), nuez del Brasil (espanhol), paranuss (alemão) e noce del Brasile (italiano), dentre outros (CAVALCANTE, 1996).

Apesar de ainda ser conhecida popularmente como castanha-do-Pará, comercialmente, a partir do Decreto-Lei nº 51.209 de 18 de setembro de 1961, passou a ser denominada, para efeito de comércio exterior, como castanha-do-Brasil (BRASIL, 1999). Na 3ª Convenção Mundial de Frutos Secos, ocorrida em 1992 em Manaus, com a participação de mais de 300 empresários, convencionou-se chamá-la de castanha-da-Amazônia (LOCATELLI et al., 2005).

### 3.1.1 Características botânicas

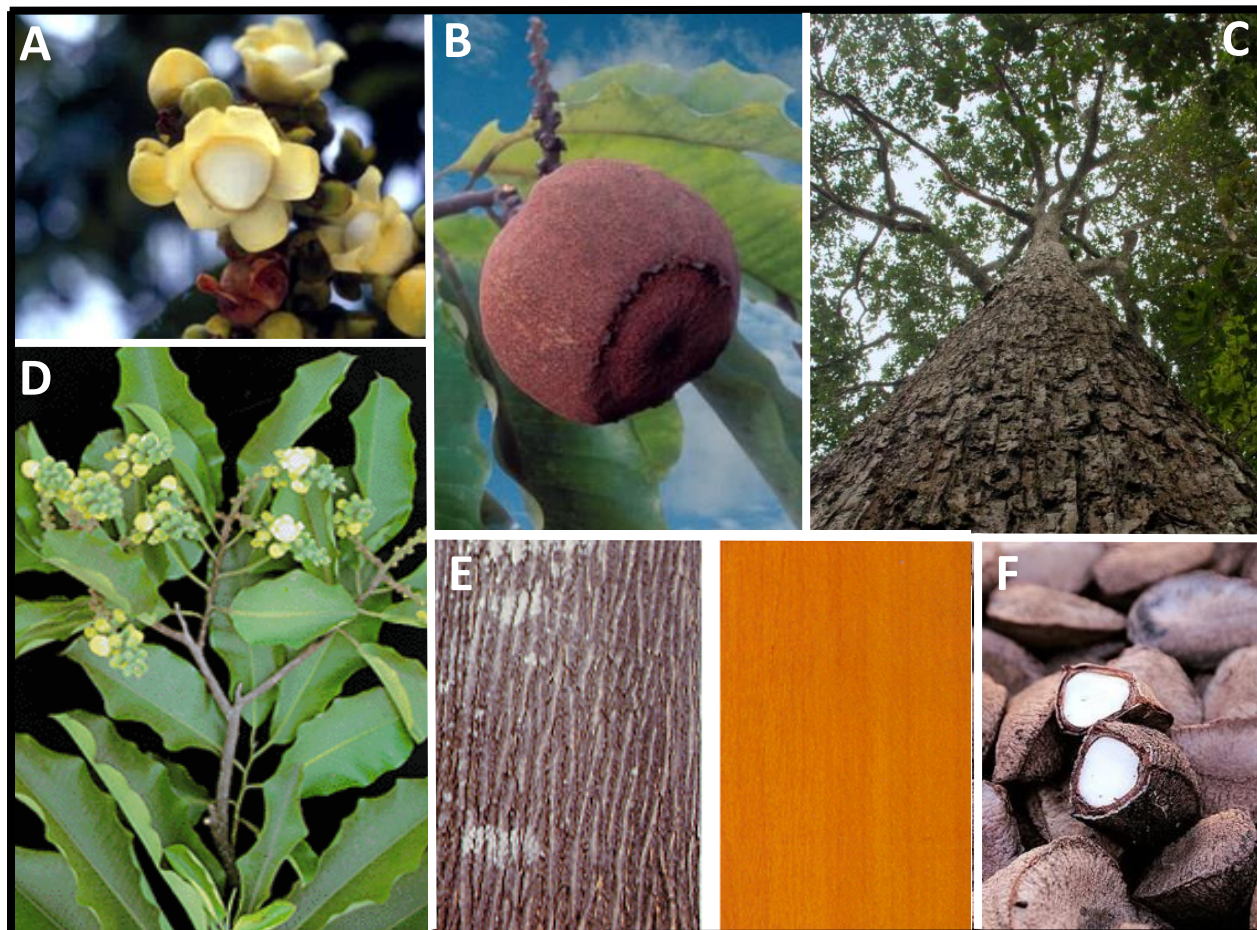
Espécie arbórea de grande porte, nativa da Amazônia, atingindo até 50 m e diâmetro de 2 m na base. Apresenta copa dominante, fuste reto, cilíndrico, liso e desprovido de ramos até a fronde, apresentando casca fendilhada de coloração pardo acinzentada (Figura 1C) (SIMÕES, 2004).

Suas folhas são em forma de calha, lâmina coriácea de base aguda e margens onduladas, esparsas, alternadas, pecioladas (cilíndrico – canaliculado), oblongas curto-acuminadas, onduladas, verde-escuras na parte superior e pálida na inferior, com nervura média levemente aveludada na parte superior com 25 a 35 cm de comprimento e 8 a 12 cm de largura (Figura 1D). As flores possuem seis pétalas brancas, tubulosas, grandes, côncavas e decíduas de coloração branco-amarelada (Figura 1A) (CAVALCANTE, 1996). Sua inflorescência é do tipo espiciforme axilar ou em panículas terminais, pouco ramificadas e eretas, raquis anguloso e pubescente, atingindo 40 cm de comprimento (Figura 1D) (OHASHI et al., 1995).

O fruto, conhecido como ouriço, é uma cápsula indeiscente, com casca lenhosa muito dura e de formato esférico levemente achatado (Figura 1B). Contém, em seu interior, uma média de dezoito sementes cujas amêndoas são altamente nutritivas. As sementes têm formato triangular-anguloso, comprimento entre 4 e 7 cm e casca bastante dura e rugosa (Figura 1F). O

polo radicular (base da semente), de onde se origina a raiz primária, é mais largo que o caulinar, responsável pela formação da parte aérea da planta (MULLER et al., 1995).

**Figura 1.** *Bertholletia excelsa*. A) Flores; B) Fruto (Ouriço); C) Fuste; D) Folhas e Inflorescência; E) Madeira. F) Sementes (Amêndoas)



Fonte: (A e B) Sibinelli (2012); (C) Zoró et al. (2008); (D e E) Lorenzi (2002); (F) Brandão (2011)

Segundo Silva e Rosa (1986), a castanheira-do-Brasil deve ter um sistema radicular muito profundo, pelo fato de não apresentar sapopemas, que contribuem para a sua fixação no solo. Estes relatos são confirmados pelo fato de que em áreas desmatadas onde a castanheira-do-Brasil é mantida em pé isolada, não se observa com frequência a queda de exemplares pela ação do vento (CAMARGO, 1997). Silva e Rosa (1986) observaram a presença de brotações diretamente das raízes, quando estas foram submetidas a cortes, durante a construção de uma estrada na região de Carajás.

### 3.1.2 Reprodução

Trata-se de uma planta alógama com síndrome de polinização melitófila. A estrutura da flor forma uma câmara composta de estaminódios congruentes que criam uma estrutura robusta, a qual esconde os estames e o estigma, restringindo e selecionando os polinizadores em relação ao seu vigor e tamanho (Figura 2). Portanto, a estrutura morfológica da flor da castanheira-do-Brasil seleciona a entrada dos polinizadores. A espécie depende da atividade dos polinizadores para assegurar a produção de frutos (MAUÉS, 2002).

**Figura 2.** Flor de castanheira-do-Brasil em cultivo no Município de Itacoatiara-AM. A) Corte transversal da flor, após antese; B) Partes reprodutivas da flor após abertura manual da lígula



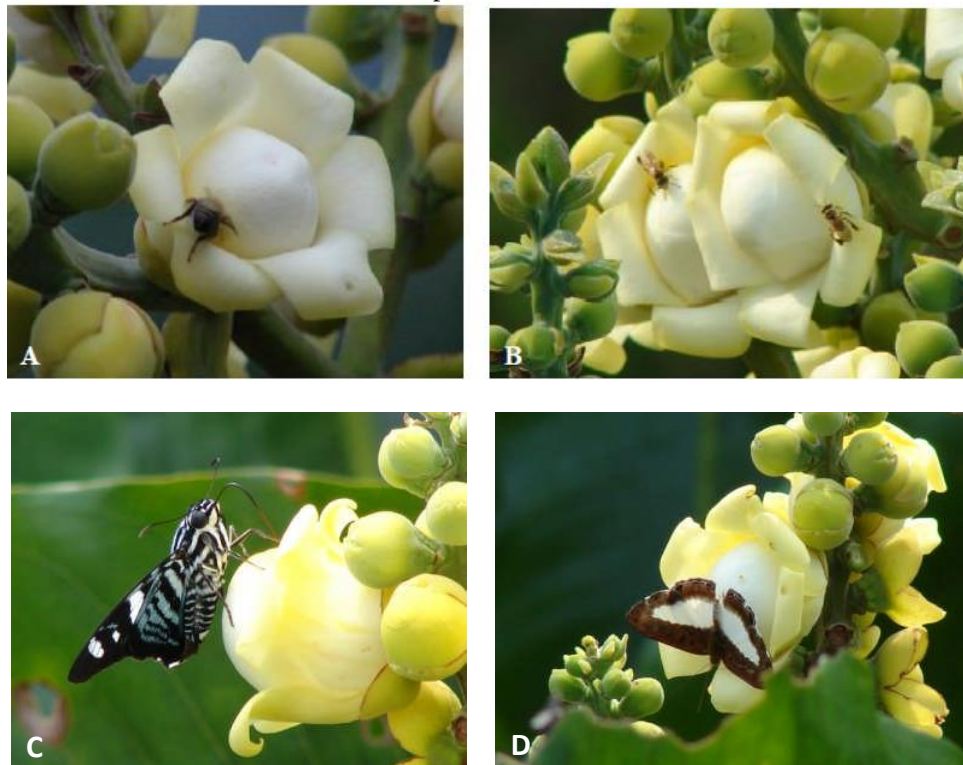
Fonte: Cavalcante, 2008

De acordo com Maués (2002), as flores são polinizadas por abelhas grandes, robustas e de língua comprida da família Apidae, pertencentes aos gêneros *Bombus* (Bombini), *Centris* e *Epicharis* (Centridini), *Eulaema* (Euglossini) e *Xylocopa* (Xylocopini) (Figura 3A e 3B). Esses polinizadores necessitam abaixar a lígula para ter acesso ao néctar e pólen oferecidos pelas flores da castanheira-do-Brasil (MORITZ, 1984).

Após a floração da castanheira-do-Brasil, o androceu e as pétalas caem e novas flores se abrem na manhã seguinte. Embora as flores dificultem o acesso direto aos seus recursos por espécies de abelhas não polinizadoras, elas não impedem completamente que outras espécies de abelhas obtenham indiretamente suas recompensas florais (3C e 3D) (MAUÉS, 2002). Essas abelhas são vigorosas e robustas, algumas delas conseguem voar longas distâncias ultrapassando

20 Km (JANZEN, 1971) o que é extremamente importante para a manutenção do fluxo genético entre as plantas alógamas na floresta tropical (MAUÉS, 2002).

**Figura 3.** A e B) Abelhas tentando penetrar nas flores de castanheira-do-Brasil no Município de Itacoatiara-AM; C e D) Borboletas coletando néctar nas flores de castanheira-do-Brasil no Município de Itacoatiara-AM



Fonte: Cavalcante, 2008

A Embrapa Acre tem conduzido estudos que visam a polinização artificial em castanheira-do-Brasil com a finalidade de incrementar a produção de castanhas tanto em florestas naturais como em plantios. Estes estudos tem ampla repercussão nos futuros trabalhos de melhoramento a serem conduzidos, pois cruzamentos direcionados entre indivíduos de alto desempenho poderão ser facilmente obtidos. A partir disso, poderão ser conduzidos testes de progênies visando produção de árvores superiores que seriam avaliadas em testes clonais com repetições. Ao final destes testes, árvores elites, seja para a produção de frutos como para a produção de madeira, poderão ser obtidas de acordo com o objetivo do programa de melhoramento genético (REIS e FILHO, 2011).

Um estudo realizado por Cavalcante (2008) objetivando a coleta de dados de diferentes testes de polinização comprovou que os maiores valores ( $p > 0,01$ ): 19,33% das flores vingaram frutos para a polinização cruzada manual, demonstrando que a castanheira-do-Brasil tem maior sucesso reprodutivo com esse tipo de polinização, uma forma de garantir a perpetuação da espécie com a maior variabilidade genética possível. Já na polinização livre foi encontrado apenas 3,05% de vingamento.

### 3.1.3 Estrutura populacional

A castanheira-do-Brasil é uma espécie emergente de grande porte. Seu caráter longo e dominante não é incompatível com seu comportamento heliófito durante as primeiras etapas da vida (SALOMÃO, 1991), dependendo de clareiras para o crescimento vertical das plântulas germinadas (MORI e PRANCE, 1990; MYERS et al., 2000). A castanheira pode ser considerada como uma espécie clímax exigente de luz (SWAINE e WHITMORE, 1988).

Estudos experimentais de curta duração e em condições diversas de intensidade de luz sugerem que as plântulas têm melhor crescimento quando as condições luminosas são intermediárias, entre 25-50% de abertura de dossel, entretanto, os aumentos de biomassa são proporcionais à disponibilidade de luz (ZUIDEMA et al., 1999; HAYASHIDA-OLIVER et al., 2001). No Norte da Bolívia, um estudo experimental com dois anos de duração, em condições de abertura de dossel variando entre 16 e 55%, comprovou que o desempenho das plântulas de castanheira melhorava com o aumento do tamanho da clareira (PEÑA-CLAROS et al., 2002).

A estrutura populacional de castanheira-do-Brasil caracteriza-se por formar aglomerações (castanhais) entre 75-150 árvores de DAP  $> 10$  cm (PERES e BAIDER, 1997), com densidades altas para os padrões das florestas tropicais úmidas (5-20 indivíduos/ha), alternando-se com áreas florestais onde a concentração é muito baixa, de até uma árvore a cada seis hectares (MORI e PRANCE, 1990). Esta disposição espacial em manchas é contestada por Wadt et al. (2005) num estudo demográfico na Reserva Extrativista de Chico Mendes (Acre), mostrando um padrão de distribuição da castanheira mais tendente a uma formação aleatória que aglomerada ou uniforme.

Dos estudos demográficos da espécie realizados até hoje, destaca-se uma tendência à baixa proporção de indivíduos com DAP  $> 10$  cm não reprodutores (SALOMÃO, 1991) e o

domínio das classes intermédias de diâmetro na distribuição das populações de castanheira-do-Brasil (PERES et al., 2003). As altas densidades de castanheiras em forma de manchas espaciais e a dominância de determinadas classes de diâmetro na estrutura demográfica da espécie tem gerado diversas discussões em relação a suas origens. Para alguns autores, as clareiras abertas na floresta, ocasionadas por queda de árvores ou outras causas, seriam as promotoras da formação de reboladas da espécie nos locais onde ela ocorre (MORI e PRANCE, 1990; SALOMÃO, 1991).

As altas densidades de castanheiras-do-Brasil em forma de ‘manchas’ ou ‘reboladas’ e a dominância das árvores de tamanho intermediário na estrutura demográfica da espécie têm sido explicada na literatura de três maneiras distintas, não necessariamente antagônicas: 1) as ‘reboladas’ de castanheiras seriam consequência da dependência desta espécie heliófita por grandes clareiras para seu crescimento juvenil (MORI e PRANCE, 1990; SALOMÃO, 1991); 2) a característica social desta espécie seria fruto do abandono de roçados ameríndios em tempos históricos, o que teria permitido o desenvolvimento de árvores de tamanhos similares de forma concentrada, 3) ou os aglomerados podem ser explicados por um padrão de remoção de curta distância promovida por cutias (*Dasyprocta* sp.), sendo raros os casos de dispersão a longa distância (PERES e BAIDER, 1997).

#### 3.1.4 Utilização

A castanheira-do-Brasil é uma das espécies mais importantes da Amazônia e uma das mais exploradas pelas comunidades extrativistas, ocupando desde 1911, lugar de destaque na pauta das exportações de produtos da Floresta Amazônica. É de uso múltiplo, já que há dois produtos de grande importância na região Norte do país: a madeira e a amêndoa, este último muito apreciado, tanto no Brasil como no exterior, onde é conhecido como *Brazilian nuts*, sendo um dos principais produtos de exportação da região. Essas amêndoas são ingredientes em diversos pratos como peixada, mingau, farofa, bolos, doces e sorvetes, além de ser um importante alimento que pode ser consumido *in natura* ou industrializado (SOUZA et al., 2008). A partir do resíduo da extração do óleo da amêndoa, obtêm-se a torta ou farelo utilizados em farinhas e rações (LOCATELLI et al., 2005).

Os ouriços são fontes de matéria-prima na produção de artesanatos (luminárias, cinzeiros, colares, chocalhos, dentre outros) assim como as amêndoas na produção de cosméticos (sabonetes, xampus, cremes hidratantes, óleo e batom) e fármacos (repelentes e cicatrizantes) (SOUZA, 2006).

A madeira é uma das mais valorizadas pela indústria madeireira, sendo indicada para construção civil interna leve, tábuas para assoalhos e paredes, painéis decorativos, forros, fabricação de compensados, embalagens etc. A espécie pode ser também uma excelente opção quando utilizada em consórcios com outras espécies florestais para o reflorestamento e na recomposição de áreas degradadas oriundas de pastagens ou de cultivos anuais (LOCATELLI et al., 2005).

O potencial de utilização da castanheira-do-Brasil em diferentes sistemas agroflorestais, localizados em diversas condições bioclimáticas na Amazônia brasileira, foi avaliado por Silva et al. (2009). Os resultados apresentaram elevada plasticidade, quando comparada com outras espécies analisadas, adaptando-se às diferentes condições bioclimáticas. Adicionalmente, a espécie apresentou características que garantem uma elevada produção de matéria seca na serrapilheira e ciclagem de nutrientes e, nos consórcios destacou-se pelo elevado crescimento em altura e diâmetro.

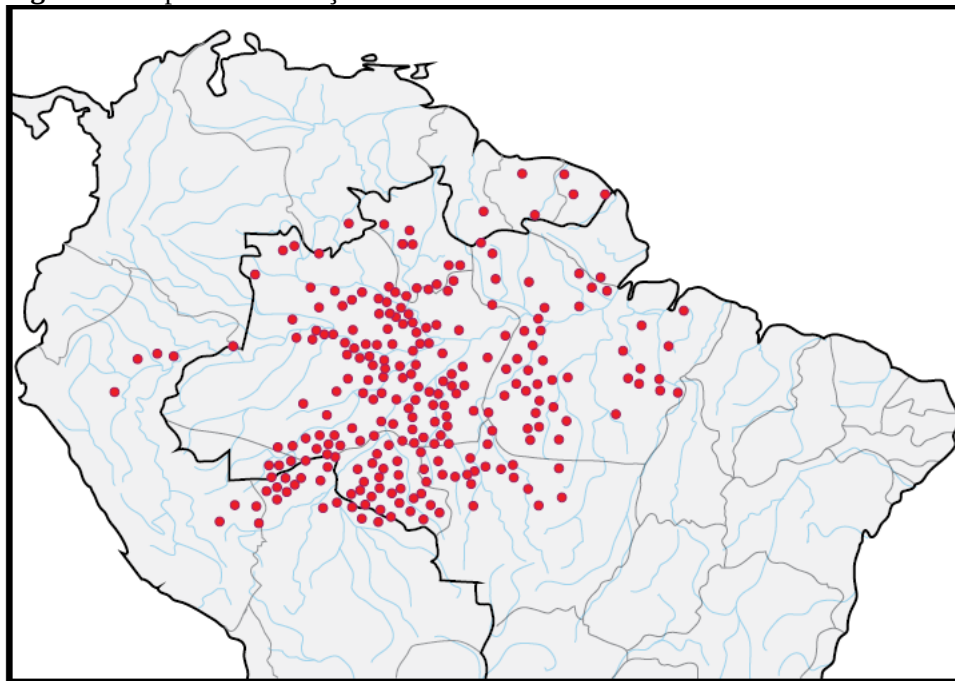
Entretanto, sua exploração em florestas naturais é proibida pelo Decreto nº 1.282 de 19 de outubro de 1994, o que não impede seu plantio com a finalidade de reflorestamento (plantios puros e sistemas consorciados). Em plantações, a espécie pode ser manejada para a produção de frutos e também de madeira (LOCATELLI et al., 2005; TRUCOM, 2012).

### 3.1.5 Ocorrência natural e distribuição geográfica

A espécie ocorre na Venezuela, Colômbia, Peru, Bolívia e Guianas, mas no Brasil existe em maior número e formações compactas, nos Estados do Pará, Amazonas, Acre, Maranhão, Mato Grosso, Rondônia, Amapá e Roraima (LOCATELLI et al., 2005) (Figura 4). Segundo Clement (1993) citado por Camargo (1997), a castanheira-do-Brasil é encontrada principalmente em solos pobres em nutrientes, bem estruturados e bem drenados. Para esse autor, a riqueza da

castanha em selênio está relacionada à similaridade química entre este elemento e o enxofre e à deficiência dos solos Amazônicos em enxofre.

**Figura 4.** Mapa de localização de Castanheira-do-Brasil



Fonte: Scoles e Gribel, 2011

### 3.1.6 Importância nutricional

Seu valor nutricional é grande para fins alimentícios, pois contém em torno de 17% de proteína – cerca de cinco vezes o conteúdo protéico do leite bovino *in natura*. Fator importante, também, é que a proteína desta semente possui os aminoácidos essenciais ao ser humano. Seu teor de gordura é extremamente elevado, em torno de 67%, com somente 7% de carboidratos (fibras), além de vitaminas A, C, B1, B2 e B5. Rica em fósforo e cálcio é o alimento do planeta mais rico em selênio (SOUZA et al., 2008).

Alguns estudos mostraram que essa oleaginosa ajuda a prevenir o câncer, esclerose múltipla, mal de Alzheimer, no equilíbrio do hormônio ativo da tireóide e age como antioxidante, protegendo o organismo contra os danos provocados pelos radicais livres devido ao seu alto teor de selênio. Fraga (2005) e Reilly (2006) destacaram o elevado teor de vitamina E. Seu percentual em  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -tocoferol está diretamente relacionado aos compostos fenólicos, que

vem sendo citados como constituintes funcionais, além de carotenoides e a presença considerável em fitosteróis totais, elemento de estrutura semelhante ao colesterol que potencializa a função imune (PHILIPS et al., 2005). Sua fração oleosa é rica em ácidos graxos monoinsaturados (48%) sendo indicada na prevenção de doenças cardiovasculares, controles glicêmicos e de peso. Uma única castanha contém a quantidade diária de selênio necessária para um adulto (55 µg) (TRUCOM, 2012).

### 3.1.7 Importância econômica

A castanheira-do-Brasil é uma das mais importantes árvores amazônicas conhecidas e sua exploração tem um papel fundamental na organização socioeconômica de grandes áreas extrativistas da floresta. A produção brasileira de amêndoas, basicamente, no que se refere ao comércio, obedece a dois fluxos: ao consumo interno e à exportação. Essa relação tem se alterado na proporção de 25 a 30% para a exportação e 70 a 75% para o consumo interno (CONAB, 2012).

Os Estados da região Norte (Amazonas, Acre e Pará) são os maiores produtores do País. Entre 2005 e 2008, o Acre foi o maior produtor da região, a partir de 2009 o Amazonas registrou um aumento de 76% em relação ao ano anterior, alcançando a primeira posição, seguido pelo Acre e Pará (BAYMA, 2013).

Em 2011, o Acre registrou o maior volume de produção de todo o período analisado, passando de 12,3 mil toneladas em 2010 para 14 mil toneladas e mantendo-se como o segundo maior produtor do País, ficando atrás somente do Amazonas, onde se registrou um volume de 14,6 mil toneladas. Mato Grosso, o único Estado produtor que não faz parte da região Norte, registrou 2,3 mil toneladas, tornando-se o quinto produtor do País (BAYMA, 2013).

Nos quatro primeiros meses de 2012, o volume total de exportações das amêndoas de castanheira-do-Brasil atingiu 4.940 toneladas, gerando uma receita de U\$S 6,5 milhões, valor 65,6% superior ao observado no mesmo período de 2011. A elevação na receita com a exportação do produto e nos volumes exportados é reflexo de uma melhora nos preços internacionais, principalmente dos compradores europeus e norte-americanos, pois são os que melhor remuneram o produto (CONAB, 2012).

Há mais de dois séculos o Brasil exporta amêndoas para o mercado europeu e americano, mas o mercado interno ainda é pouco desenvolvido e faltam informações sobre dados do mercado de amêndoas com casca e sem casca. As exportações de amêndoas com casca são três vezes maiores do que as de amêndoas sem casca e processadas (com um maior valor agregado) (ENRÍQUEZ, 2009).

Atualmente está ocorrendo uma queda da produção relacionada com a falta de incentivos governamentais aos produtores extrativistas, ao desmatamento da região Amazônica, que vem causando uma redução das áreas de plantio das castanheiras para dar espaço a outras culturas, apesar da proibição do corte de exemplares nativos. Também existe a falta de dados do governo brasileiro sobre extrativismo (TAVARES, 2010).

Existem também problemas na organização das cooperativas, as principais responsáveis pela extração da amêndoa (EMBRAPA, 2009). De acordo com Vilhena (2004), as cooperativas precisam agregar valor, diversificar os produtos originados da castanheira-do-Brasil e concorrer com o mercado externo. Na atividade de extração da matéria-prima não há internalização do conhecimento, especialização da mão-de-obra e verticalização da produção na comunidade.

Segundo o mesmo autor, é preciso adotar o conceito do neoextrativismo (conceito relacionado à totalidade social, a todas as instâncias da vida social: a econômica, a política e a cultural), em que serão possíveis, na dimensão econômica, a incorporação do progresso técnico e o uso de novas alternativas de exploração de recursos, que estejam associados ao cultivo, criação e beneficiamento da produção.

### **3.2 Diversidade genética**

De acordo com Borém et al. (2009), até o momento, são escassos os estudos e resultados sobre a estrutura populacional e genética de castanheira-do-Brasil. Há resultados de diversidade genética em populações do Pará (BURCKLEY et al., 1988; O'MALLEY et al., 1988) e do Acre (KAGEYAMA et al., 2003). No Pará, a estrutura genética foi avaliada por marcadores izoenzimáticos, sendo encontrada pouca variabilidade, pequena diferenciação genética entre populações (BURCKLEY et al., 1988) e elevada taxa de cruzamento (O'MALLEY et al., 1988).

Kageyama et al. (2003), usando marcadores RAPD, encontraram maior diversidade genética que nos outros estudos.

Pamplona (2000), ao estudar a variabilidade genética no cruzamento de meio-irmãos de castanheira-do-Brasil, observou maior ganho de volume de copa, o que pode indicar maior produção de frutos, haja vista a correlação positiva entre área da copa e produção (ZUIDEMA, 2003; KAINER et al., 2007). Além do ganho no volume da copa, obteve-se aumento significativo nas seguintes características: altura da copa e diâmetro do tronco, proporcionando uma árvore com maior volume de madeira e, maior produção e lucro em uma mesma área.

O estabelecimento de estratégias eficientes de melhoramento depende essencialmente do conhecimento prévio dos mecanismos genéticos responsáveis pela herança do caráter a melhorar, tais como o número de genes que o governam, as ações e efeitos gênicos, herdabilidade, repetibilidade e associações genéticas com outros caracteres (RESENDE, 2002).

### 3.2.1 Marcadores moleculares

Com o surgimento das modernas técnicas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA, denominados marcadores moleculares. Atualmente, um grande número de marcadores moleculares altamente polimórficos pode ser obtido de qualquer organismo vivo. Os distintos tipos de marcadores disponíveis hoje em dia diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade em nível de DNA (PASQUAL et al., 2001).

De acordo com Pasqual et al. (2001), entre suas propriedades, um marcador genético (I) deve ser capaz de diferenciar os progenitores e (II) deve ser reproduzido com precisão na progênie. Do ponto de vista molecular, um marcador genético (ou *locos* marcador) serve para identificar um local ou uma região de um cromossomo. Um marcador ideal deve apresentar uma série de atributos, (III) detectar grande número de *locos* não ligados e (IV) herança simples. Entretanto, a simplicidade e os baixos custos do método são fatores determinantes no uso de um marcador molecular de forma rotineira.

Os distintos tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis, cada um utilizando uma estratégia particular para detectar polimorfismos de DNA, variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade.

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP e microssatélites ou *locos* VNTR. Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD; SCAR; STS (Sequence Tagged Sites); Microssatélite; e AFLP (VOS et al., 1995).

A utilização de marcadores moleculares pode ser classificada em aplicações de curto, médio e em longo prazo. As aplicações de curto prazo envolvem, basicamente, a identificação de discriminação de genótipos. Nas aplicações de médio e em longo prazo, os marcadores permitem quantificar a variabilidade genética existente ao nível de sequência de DNA e correlacioná-la com a expressão fenotípica em mapeamentos genéticos (PASQUAL et al., 2001).

### 3.2.2 AFLP

Os marcadores gerados pela análise de AFLP associam os polimorfismos gerados por enzimas de restrição com a capacidade de detecção da técnica de PCR. O DNA total da planta é clivado por enzimas de restrição, originando um número extremamente elevado de fragmentos que, em função da concentração, não são detectados em eletroforese. Pequenas sequências de DNA (adaptadores) são acopladas às extremidades desses fragmentos de restrição, as quais se anelarão com oligonucleotídeos específicos, durante a PCR (pré-amplificação e amplificação seletiva). Os fragmentos gerados são então separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (OLIVEIRA, 2007). Esse tipo de marcador apresenta vantagens comparativas, tais como detecção de maior número de *locos*, cobertura ampla do genoma e baixo custo (LOPES et al., 2002). As desvantagens são a dominância dos marcadores, o alto custo e as várias etapas e reagentes necessários à obtenção dos marcadores (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

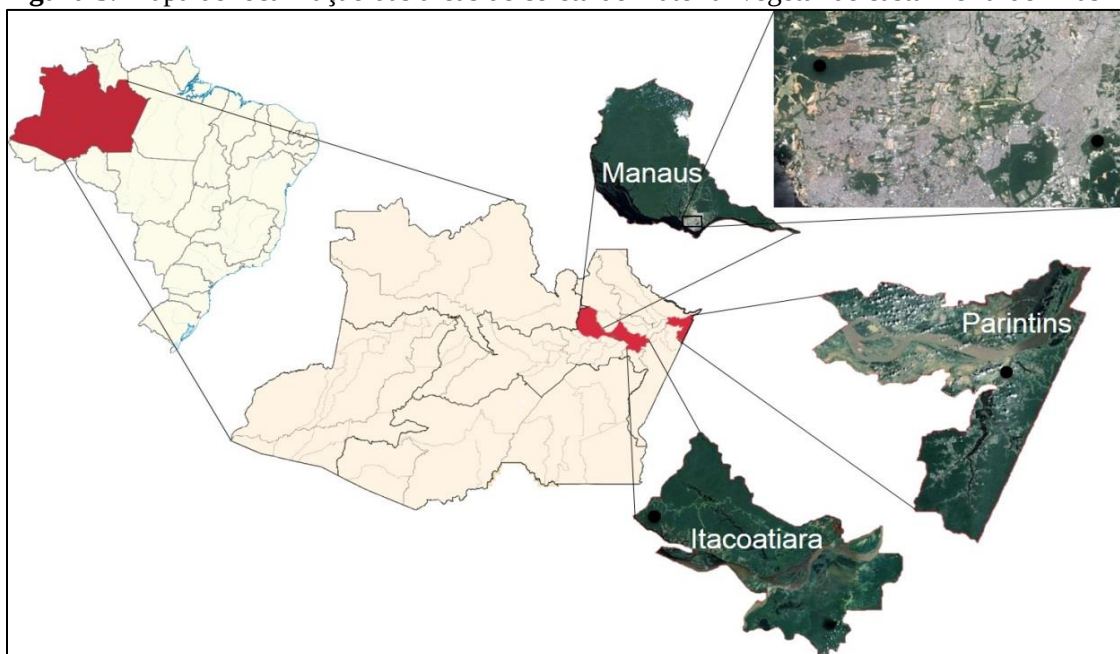
### 4.1 Coleta do material vegetal

Os 150 acessos de castanheira-do-Brasil foram provenientes de cinco populações, sendo duas em Manaus, duas na Fazenda Aruanã, em Itacoatiara e uma em Parintins, com 30 acessos de cada população, todas localizadas no Estado do Amazonas (Figura 5). As populações foram devidamente identificadas e suas posições geográficas foram registradas usando o GPS (Tabela 1).

**Tabela 1.** Locais de coleta e coordenadas geográficas das populações de castanheira-do-Brasil

| Locais de coleta | Coordenadas  |               |
|------------------|--------------|---------------|
|                  | Latitude     | Longitude     |
| Aruanã Carolina  | 2°59'43.81"S | 58°49'38.26"W |
| Aruana Brastor   | 3°00'7.45"S  | 58°49'9.68"W  |
| Parintins        | 2°40'12.10"S | 56°44'8.96"W  |
| Manaus IFAM      | 3°4'43"S     | 59°55'57"W    |
| Manaus Aeroporto | 3°2'32.92"S  | 60°1'43.70"W  |

**Figura 5.** Mapa de localização das áreas de coleta do material vegetal de castanheira-do-Brasil



Folhas intermediárias e sem manchas foram coletadas, acondicionadas em sacos de papel com sílica gel e levadas para armazenamento a -20 °C para total secagem. No Laboratório de Evolução Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da UFAM foi realizada a extração de DNA e, posteriormente, foi realizada a análise com marcadores AFLP no Laboratório de Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias da UFAM.

## 4.2 Áreas de estudo

### 4.2.1 Fazenda Aruanã

A Fazenda Aruanã S.A. é uma empresa agrícola fundada em 1970, especializada em culturas tropicais na Amazônia e está localizada na Rodovia Manaus-Itacoatiara, Km 215, município de Itacoatiara - AM. Sua sede é na Fazenda Aruanã com área de 12.000 hectares, sendo destes 3.600 hectares de castanheira-do-Brasil em cultivo com 20 variedades diferentes, plantadas sob espaçamento de 20 x 20 m que totaliza em aproximadamente 318.000 árvores enxertadas em fase de início de produção de frutos e 900.000 formam um estoque de árvores para produção de madeira, além de áreas já plantadas com árvores de dois anos de idade para reposição florestal de fazendeiros que têm de repor parte das suas áreas desmatadas, conforme normas do IBAMA.

Sua maior especialidade é o cultivo da castanheira-do-Brasil e da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) para palmito. A cada 600 hectares de cultivo de Castanheira-do-Brasil existem faixas de 500 metros de vegetação nativa, além de faixas de aproximadamente 12 metros de mata secundária dentro do cultivo de castanheiras. A propriedade dispõe ainda do único jardim clonal nacional de castanheira-do-Brasil, uma vez que o da EMBRAPA foi destruído recentemente pelo fogo. Do estoque de árvores para produção de madeira, duas populações foram escolhidas de forma aleatória para a coleta do material para análise neste trabalho.

#### 4.2.2 Parintins

Parintins é um município do Estado do Amazonas, próximo à divisa com o Estado do Pará, região Norte e está localizado a 325 Km a Leste de Manaus. O material coletado neste Município foi realizado no bairro Macurany, nas proximidades da construção do Residencial Vila Cristina, onde há centenas de castanheiras naturais com mais de 100 anos.

A empresa NV Construções Ltda está construindo, na primeira etapa do complexo Vila Cristina, 500 unidades residenciais e uma área de 15 hectares, da área total do complexo foi resguardada para preservar mais de mil castanheiras naturais. Segundo a empresa foram derrubadas 81 árvores, mas os moradores da região divergem quanto a informação e relataram que houve o corte de mais de 200 árvores. A cidade encontra-se em processo de expansão urbana e árvores protegidas por Lei estão sendo derrubadas em meio a um conflito de interesses.

#### 4.2.3 Manaus IFAM - Instituto Federal do Amazonas – Zona Leste

O Campus Zona Leste do IFAM, anteriormente chamado de Escola Agrotécnica Federal de Manaus – EAFM está localizado na Avenida Cosme Ferreira, no Bairro São José Operário, na cidade de Manaus.

O material vegetal coletado foi de árvores com idade aproximada de 75 anos em um castanhal plantado em monocultivo com consórcio da cultura de café (*Coffea* sp.).

#### 4.2.4 Manaus Aeroporto

Os acessos selecionados foram de castanheiras naturais no entorno da Av. Torquato Tapajós e em uma chácara localizada na mesma avenida, no bairro Tarumã, na cidade de Manaus.

### 4.3 Extração e Quantificação do DNA

O DNA genômico foi extraído pelo método CTAB baseado no protocolo de Doyle e Doyle (1987) com adaptações. Foram pesados 60 mg de tecido foliar (sem a nervura principal),

transferidos para microtubo plástico de 2 mL com quatro *beads* de metal e macerados em homogeneizador Precellys<sup>®</sup> usando o programa 6.000 rpm por 10 s, ao qual adicionou-se 1 mL do tampão de extração (CTAB = 1,4 M de cloreto de sódio, 20 mM de ácido etilenoaminotetracético (EDTA), 100 mM de Tris-HCl (pH 8,0)), 1% de PVP e 0,2% de  $\beta$ -mercaptoetanol, previamente aquecido a 65 °C.

O material foi levemente agitado por inversão por 10 s a cada 10 min e mantido em banho-maria por 1 h. Após este período, adicionou-se 4  $\mu$ L de RNase a 20 mg/mL, deixou-se descansar em temperatura ambiente por 15 min e centrifugou-se a 11.000 rpm por 1 min e removeu-se o sobrenadante para novo microtubo previamente identificados.

Adicionou-se 600  $\mu$ L de clorofórmio:álcool-isoamilico (24:1 v/v) e foi homogeneizado por inversão do microtubo durante 5 min. A amostra foi centrifugada por 10 min a 12.000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo, onde se realizou a segunda extração da fase aquosa com o mesmo procedimento da primeira.

O DNA foi precipitado, pela primeira vez, acrescentando-se 400  $\mu$ L de isopropanol gelado (-20 °C) ao sobrenadante. A solução foi levemente agitada por inversão e incubada a -20 °C por 30 min para facilitar a precipitação do DNA. Após este período, a amostra foi centrifugada a 8.500 rpm por 15 min e o sobrenadante foi descartado.

O *pellet* de DNA foi lavado duas vezes com etanol 70% (1 mL, cada) e uma vez com etanol absoluto (1 mL), ambos gelados e deixado para secar à temperatura ambiente. Após a completa retirada do etanol, o DNA foi ressuscitado em 50  $\mu$ L de água ultrapura e estocado à -20 °C. Durante a extração orgânica, as proteínas contaminantes são desnaturadas e mantidas na fase orgânica ou na interface entre as fases orgânica e aquosa, enquanto os ácidos nucleicos permanecem na fase aquosa.

Para a quantificação, 1  $\mu$ L de DNA ressuscitado foi diluído em solução contendo 2  $\mu$ L do corante azul de bromofenol e 7  $\mu$ L de água ultrapura. Este volume (10  $\mu$ L) foi aplicado em gel de agarose 0,8 % (p/v). Para avaliar a intensidade da fluorescência das bandas, também foi aplicado DNA do fago  $\lambda$  (GIBCO-BRL) íntegro, no gel, em concentrações conhecidas (20, 50 e 100 ng), para a posterior comparação visual. A eletroforese foi realizada a 3 V/cm durante 1 h. O gel foi corado com solução de brometo de etídeo (10 mg/mL) durante 15 min e fotografado sob luz ultravioleta no fotodocumentador Geldoc - Bio Rad.

A concentração de DNA de cada amostra no gel foi estimada, obtendo-se a concentração de DNA nos estoques em ng/ $\mu$ L. Foram preparadas alíquotas contendo a mesma concentração de DNA diluído em água ultrapura para todos os indivíduos.

#### 4.4 Desenvolvimento de marcadores AFLP

Os genótipos foram identificados para os *locos* marcadores (Dominantes) do tipo AFLP (VOS et al., 1995) cuja técnica foi adaptada por Lopes et al. (2002) que consistiu das etapas a seguir descritas:

##### 4.4.1 Restrição do DNA

O DNA genômico foi duplamente digerido através da combinação de uma enzima de corte raro com outra de corte frequente, ambas de corte coesivo. Para isso, 6,0  $\mu$ L de DNA (300 ng) foram digeridos usando 0,6  $\mu$ L de *Eco*RI (5 U/ $\mu$ L) (corte raro) (Promega<sup>®</sup>) e 0,5  $\mu$ L de *Mse*I (5 U/ $\mu$ L) (corte frequente) (New England Biolabs<sup>®</sup>) em solução contendo 5,0  $\mu$ L (10X) do tampão universal *One Phor All* (Amersham<sup>®</sup>), 0,5  $\mu$ L (100X) BSA (New England Biolabs<sup>®</sup>) e água ultrapura esterilizada, num volume final de 50  $\mu$ L de reação. O material foi incubado no termociclador ESCO<sup>®</sup> PCR Thermal Cyclers por 3 h a 37 °C para restrição e, em seguida, por 15 min a 70 °C para inativar as endonucleases.

##### 4.4.2 Preparo dos Adaptadores

O preparo dos adaptadores específicos (Tabela 2) aos terminais clivados por cada enzima ocorreu do seguinte modo:

- Adaptador *Eco*RI: foi preparada uma solução contendo 5,6  $\mu$ L de adaptador *Eco*RI *forward*, 4,8  $\mu$ L de adaptador *Eco*RI *reverse*, 6  $\mu$ L de tampão *One Phor All* (Amersham<sup>®</sup>) e água ultrapura esterilizada para o volume final de 120  $\mu$ L.

- Adaptador *MseI*: foi preparada uma solução contendo 64  $\mu\text{L}$  de adaptador *MseI forward*, 56  $\mu\text{L}$  de adaptador *MseI reverse*, 7  $\mu\text{L}$  de tampão *One Phor All* (Amersham<sup>®</sup>) e água ultrapura esterilizada para o volume final de 140  $\mu\text{L}$ .

Os adaptadores foram incubados no termociclador ESCO<sup>®</sup> PCR Thermal Cyclers, em programa, a 65, 37 e 25 °C por 10 min, para cada adaptador.

#### 4.4.3 Ligação dos adaptadores

Para ligar os adaptadores foi acrescentado ao material digerido um *mix* de 10  $\mu\text{L}$ , contendo 1,0  $\mu\text{L}$  de adaptador *EcoRI*, 1,0  $\mu\text{L}$  de adaptador *MseI*, 1,0  $\mu\text{L}$  de tampão para a enzima T4 DNA Ligase (10X), 0,33  $\mu\text{L}$  da enzima T4 DNA Ligase (3 U/ $\mu\text{L}$ ) (New England BioLabs<sup>®</sup>) e água ultrapura esterilizada para completar o volume. Para que a ligação ocorresse, o material foi mantido a 23 °C por 3 h e estocado a -20 °C.

#### 4.4.4 Reações de Amplificação

Foram realizadas duas reações consecutivas com oligonucleotídeos complementares aos adaptadores. Na reação de pré-amplificação foram utilizados oligonucleotídeos de *EcoRI* e *MseI*, com extensão de um nucleotídeo na extremidade 3'. Os produtos da reação de pré-amplificação foram diluídos e uma alíquota dos mesmos foi utilizada como *template* na reação de amplificação seletiva, na qual foram utilizados três nucleotídeos seletivos adicionados na extremidade 3' dos oligonucleotídeos.

##### a) Pré-Amplificação

A pré-amplificação foi realizada em um volume final de 20  $\mu\text{L}$  contendo 1,2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 0,8  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10 mM), 1,0  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleotídeo contendo um nucleotídeo seletivo adicionado à extremidade 3': oligo *EcoRI* (25 ng/ $\mu\text{L}$ ) + A e oligo *MseI* (25 ng/ $\mu\text{L}$ ) + C (Tabela 2), 2,0  $\mu\text{L}$  de tampão da enzima *Taq* DNA polimerase (10X) (Fermentas<sup>®</sup>), 0,6  $\mu\text{L}$  de *Taq* DNA polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ) (Fermentas<sup>®</sup>), 2,0  $\mu\text{L}$  de DNA digerido e ligado, mais

água ultrapura para completar o volume. As condições para a PCR foram: 94 °C por 2 min, seguindo-se de 26 ciclos de 94 °C por 1 min, 56 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e uma extensão final de 72 °C por 5 min. Os produtos pré-amplificados foram diluídos em 40 µL de água ultrapura esterilizada e armazenados a -20 °C.

#### b) Amplificação Seletiva

Na amplificação seletiva foram utilizadas dez combinações de oligonucleotídeos em uma amostra aleatória de cinco indivíduos da coleção: *EcoRI*-AAC/ *MseI*-CAC, *EcoRI*-AAC/ *MseI*-CTC, *EcoRI*-AAC/ *MseI*-CAT, *EcoRI*-ATC/ *MseI*-CCA, *EcoRI*-AGC/ *MseI*-CAT, *EcoRI*-AGC/ *MseI*-CCA, *EcoRI*-ACA/ *MseI*-CAC, *EcoRI*-ACA/ *MseI*-CAT, *EcoRI*-ACA/ *MseI*-CGC e *EcoRI*-ACA/ *MseI*-CTC. Os oligonucleotídeos com maior número de *locos* polimórficos foram amplificados em todos os indivíduos da coleção (*EcoRI*-ATC/ *MseI*-CCA, *EcoRI*-AGC/ *MseI*-CAT, *EcoRI*-AGC/ *MseI*-CCA e *EcoRI*-ACA/ *MseI*-CAC).

As reações de amplificação seletiva via PCR foram realizadas em solução composta por 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,4 µL de dNTPs (10 mM), 1,0 µL do oligo *EcoRI* (25 ng/µL) + ANN, 1,2 µL do oligo *MseI* (25 ng/µL) + CNN (Tabela 2), 2,0 µL de tampão da enzima *Taq* DNA polimerase (10X) (Fermentas®), 0,2 de *Taq* DNA polimerase (5 U/µL) (Fermentas®), 2,5 µL de DNA dos produtos pré-amplificados e diluídos, e água ultrapura para completar o volume de 20 µL. A PCR ocorreu nas seguintes condições: desnaturação a 94 °C por 2 min, seguindo-se de 12 ciclos de 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s, 72 °C por 1 min mais 23 ciclos nas mesmas condições, modificando-se somente a temperatura de anelamento para 56 °C e uma extensão final de 72 °C por 2 min.

**Tabela 2.** Sítios das enzimas de restrição, sequências de adaptadores e de oligonucleotídeos usados para as análises de polimorfismo de comprimentos de fragmentos amplificados

| Enzima       | Sítio de Restrição | Especificação            | Sequência <sup>1</sup>            |
|--------------|--------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| <i>EcoRI</i> | 5' G AATTC 3'      | Adaptador <i>forward</i> | 5' CTC GTA GAC TGC GTA CC – 3'    |
|              | 3' CTTAA G 5'      | Adaptador <i>reverse</i> | 5' AAT TGG TAC GCA GTC TAC – 3'   |
|              |                    | <i>Primer E + A</i>      | 5' GAC TGC GTA CCA ATT CA – 3'    |
|              |                    | <i>Primer E + ANN</i>    | 5' GAC TGC GTA CCA ATT CAN N – 3' |
| <i>MseI</i>  | 5' T TAA 3'        | Adaptador <i>forward</i> | 5' GAC GAT GAG TCC TGA G – 3'     |
|              | 3' AAT T 5'        | Adaptador <i>reverse</i> | 5' TAC TCA GGA CTC AT– 3'         |
|              |                    | <i>Primer M + C</i>      | 5' GAT GAG TCC TGA GTA AC – 3'    |
|              |                    | <i>Primer M + CNN</i>    | 5' GAT GAG TCC TGA GTA ACN N – 3' |

<sup>1</sup>N: nucleotídeo arbitrário usado na amplificação seletiva

#### 4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (acrilamida/bis-acrilamida (19:1 v/v)). Para o preparo da matriz de poliacrilamida usou-se 50,4 g de uréia, 0,36 g de bis-acrilamida e 7,2 g de acrilamida com o volume final ajustado para 120 mL de tampão 1X TEB (Tris base, Ácido bórico e EDTA). Foi usado o sistema de gel de sequenciamento "Sequi-Gen GT" (Biorad), com dimensões 38 x 50 cm e fonte de 3.000 V.

Para a montagem das placas, as mesmas foram previamente limpas utilizando-se etanol 95%. Na placa maior (de acrílico), foram aplicados 1,5 mL de Repel químico, aguardou-se 5 min para secagem do produto e em seguida aplicou-se álcool 95% com leves movimentos para a retirada do excesso. Para o tratamento da placa menor, foram colocados em microtubo de 1,5 mL: 1 mL de etanol 95 %, 5 µL de ácido acético glacial e 5 µL de bind químico. Em seguida, o produto foi aplicado sobre a placa menor (de vidro) e cuidadosamente espalhado. Aguardou-se a secagem do produto por 5 min e, em seguida, aplicou-se álcool 95% para a retirada do excesso.

Foi utilizado lenços de papel, tanto na limpeza das placas como na aplicação e retirada do excesso do produto.

Para o preparo do gel de poliacrilamida, utilizou-se 120 mL da matriz, 120  $\mu$ L de TEMED e 800  $\mu$ L de persulfato de amônia (95 mg/mL). O gel permaneceu, no mínimo, por 4 h em processo de polimerização. Na parte superior da cuba foi utilizado aproximadamente 1,2 L TEB 1X e na parte inferior 350 mL de TEB 1X adicionado com 50 mL de acetato de sódio 3M. Antes da aplicação das amostras, foi realizada uma pré-corrida conduzida sob potência constante de 80 W durante 1 h, para aquecimento e limpeza do gel.

Nas amostras, para aplicação no gel, foram adicionados 8  $\mu$ L de loading buffer (formamida 98%, EDTA 10 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,002% (p/v)) e xilenocianol 0,002% (p/v). Para desnaturação, as amostras foram submetidas por 5 min à temperatura de 95 °C em termociclador ESCO® PCR Thermal Cyclers.

Em seguida realizou-se a aplicação de 20  $\mu$ L da amostra desnaturada, sendo o restante, descartado. Após a aplicação das amostras, procedeu-se a eletroforese sob potência constante de 80 W durante 3 h.

#### **4.6 Revelação do gel**

Para a revelação do gel, usou-se o método de coloração com nitrato de prata segundo o protocolo proposto por Creste et al. (2001).

Após a eletroforese, as placas foram cuidadosamente separadas e o gel aderido à placa menor foi submetido à revelação dentro de bandejas plásticas. Inicialmente, o gel foi imerso em 3 L de solução para fixação (etanol 10% e ácido acético glacial 1%) e mantido sob lenta agitação durante 10 min. Após a fixação, o gel foi lavado sob agitação em 3 L de água destilada durante 1 min e, então, submetido a um pré-tratamento pela imersão em solução de oxidação (ácido nítrico 1,5% - 3 L) durante 2,40 min. Retirado da solução de oxidação, o gel foi lavado em 3 L de água destilada sob agitação durante 1 min e, em seguida, imerso em 3 L da solução para impregnação da prata ( $\text{AgNO}_3$  0,2%) por 20 minutos sob agitação. Da impregnação, o gel passou por duas lavagens de 30 segundos em 3 L de água destilada sob agitação. O gel foi então imerso em 1  $\frac{1}{2}$  L de solução para revelação ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3% e formaldeído 0,02%) mantendo a agitação lenta e

constante. Quando começaram a surgir as primeiras bandas e a solução de revelação apresentava-se saturada (escura), o gel foi transferido para 1 ½ L de nova solução de revelação, sempre sob agitação lenta e constante. Após obter o padrão de revelação desejado, o gel foi transferido para uma bandeja com 3 L de solução bloqueadora (ácido acético glacial 5%) e mantido por 5 min sob lenta agitação. Em seguida, foi feita a lavagem final em 3 L de água destilada sob agitação durante 1 min. Os géis foram mantidos à temperatura ambiente para secar e depois foi realizada a leitura das bandas, no qual a presença foi representada por 1 (um) e a ausência por 0 (zero).

#### 4.7 Análises estatísticas de marcadores AFLP

Para a análise dos dados foi utilizado o software Genes (CRUZ, 2013). Após a leitura das placas, verificando ausência ou presença de bandas amplificadas, confeccionou-se uma matriz binária. Os dados da matriz binária obtidos a partir dos marcadores moleculares foram a construção de uma matriz de dissimilaridade por meio do complemento aritmético do coeficiente de Jaccard obtido pela expressão:

$$D_j = 1 - \left( \frac{a}{a + b + c} \right)$$

Sendo  $a$ ,  $b$  e  $c$ , presença de banda em ambos os acessos, presença de banda no primeiro e ausência no segundo, ausência no primeiro e presença no segundo, respectivamente.

Para obtenção do dendrograma, a matriz de dissimilaridade foi utilizada no método de agrupamento hierárquico da ligação média entre grupos (UPGMA). Como regra geral, a construção do dendrograma é estabelecida pelo genótipo de maior similaridade. Inicialmente o primeiro grupo é formado pelos genótipos mais similares, logo em seguida calcula-se a distância entre este grupo e os demais genótipos, sendo novamente agrupados os indivíduos dos grupos de maior similaridade. A distância entre os grupos é determinada pela média das distâncias entre pares de indivíduos pertencentes aos diferentes grupos, sendo uma expressão geral para este método:

$$d_{(ij)k} = \frac{n_i}{n_i + n_j} d_{ik} + \frac{n_j}{n_i + n_j} d_{jk}$$

Em que  $d_{(ij)k}$  é a distância entre o grupo  $(ij)$ , com tamanho interno  $n_i$  e  $n_j$ , respectivamente, caracterizando  $i$ ,  $j$  e  $k$  como indivíduos ou grupos (CRUZ e CARNEIRO. 2003). O ponto de corte dos dendrogramas foram estimados pelo índice de Mojema.

A diferenciação genética dentro e entre populações foi testada pela análise de Variância molecular (AMOVA) e a análise do *bootstrap* foi realizada com 5.000 simulações utilizando o programa Genes (CRUZ, 2013).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

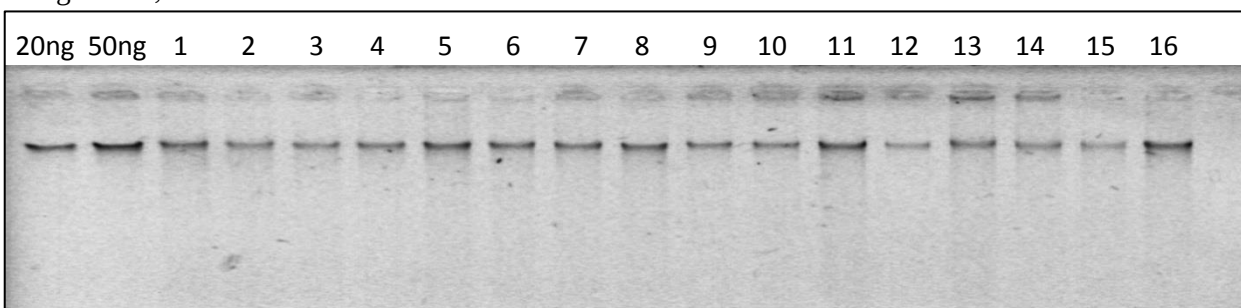
### 5.1 Extração e quantificação de DNA

O DNA extraído por meio do protocolo utilizando o detergente CTAB apresentou resultados satisfatórios para todas as populações de castanheira-do-Brasil. Foi possível extrair o DNA genômico total das amostras analisadas em quantidades e qualidades suficientes. A otimização do protocolo foi realizada quanto à quantidade de material vegetal utilizado (60 mg), quanto ao programa no homogeneizador de tecidos (6.000 rpm/ 1 x 10 s); adição de PVP na eliminação de polissacarídeos; e aplicação da RNase a 20 mg/mL.

A análise da integridade e qualidade dos DNAs extraídos, verificada pela eletroforese em gel de agarose 0,8% está apresentada na Figura 6. Foram obtidas amostras íntegras de DNA, pois não se observou arraste vertical dos DNAs no gel. A integridade do DNA é fundamental para a clareza e reprodutibilidade dos produtos de amplificação pela PCR. Também foi verificada baixa concentração de polissacarídeos nas amostras, pois as bandas não apresentaram forma cônica em direção ao polo positivo (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

A extração de DNA puro de boa qualidade é pré-requisito para qualquer análise molecular. Existem várias metodologias disponíveis para o isolamento de DNA genômico de plantas, mas na prática, esses procedimentos são empíricos em função da variabilidade existente na composição do tecido vegetal utilizado. Os métodos convencionais simples de extração de DNA não são necessariamente reproduzíveis para todas as espécies, sendo necessárias adaptações e modificações (ARAS et al., 2003).

**Figura 6.** Quantificação de DNA de 16 acessos de castanheira-do-Brasil da população de Parintins em gel de agarose 0,8%



## 5.2 Seleção de oligonucleotídeos

Entre as dez combinações de oligonucleotídeos testada, quatro foram selecionadas por produzirem fragmentos de boa qualidade, intensidade com elevado número de *locos* amplificados assim como um padrão uniforme no perfil de amplificação para a realização da leitura binária.

Uma seleção prévia dos oligonucleotídeos que deverão ser utilizados para a análise de diversidade genética de uma população é um passo importante. Como a sequência de nucleotídeos dos oligos de AFLP reconhecem oligos arbitrários à etapa de teste e seleção, torna-se essencial antes de utilizá-los para avaliar todas as amostras da população, evitando assim o uso de oligonucleotídeos que não amplificam ou que geram poucos fragmentos e baixo polimorfismo, dificultando o estudo da diversidade genética presente em determinada espécie (BASSI et al., 2010).

## 5.3 Níveis de polimorfismos detectados pelos marcadores AFLP

Nas quatro combinações com as enzimas de restrição (oligonucleotídeos seletivos) avaliadas, houve amplificação de um total de 328 *locos*, dos quais 306 (93,3%) foram polimórficos e 22 (6,7%) foram monomórficas. O'Malley et al. (1988) observaram que, dentro de uma mesma população de castanheira-do-Brasil, existe um elevado nível de variação genética devido a uma alta taxa de cruzamento entre indivíduos. Gusson (2003), estudando a estrutura genética de biribá (*Eschweilera ovata* [Cambess.] Miers), por meio de isoenzimas, encontrou 85,4% de *locos* polimórficos em árvores adultas. Müller e Vieira (2010) avaliando a diversidade genética entre e dentro de populações naturais de castanheira-do-Brasil por meio de marcadores ISSR onde foram avaliados 56 indivíduos provenientes de três populações do Estado de Mato Grosso, encontraram 81,18% de polimorfismo.

Entre as combinações estudadas, a combinação que apresentou o maior número de *locos* informativos foi E + AGC / M + CAT (100) e a menos informativa foi E + ACA / M + CAC (69) (Tabela 3). A média de *locos* polimórficos detectados em cada população variou de 44,5 para Aruanã Brastor a 57,5 para Aruanã Carolina. As populações de Parintins, Manaus IFAM e

Manaus Aeroporto apresentaram níveis intermediários de polimorfismo que foram 55, 50 e 52, respectivamente.

**Tabela 3.** Lista de combinação de oligonucleotídeos e número de *locos* polimórficos para cada população de castanheira-do-Brasil

| Combinações<br>de oligonucleotídeos | Total de<br><i>Locos</i> | Nº de <i>Locos</i> polimórficos |                   |            |                |                     | TOTAL      |
|-------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|-------------------|------------|----------------|---------------------|------------|
|                                     |                          | ARUANÃ<br>CAROLINA              | ARUANÃ<br>BRASTOR | PARINTINS  | MANAUS<br>IFAM | MANAUS<br>AEROPORTO |            |
| E + AGC / M + CAT                   | 100                      | 81                              | 78                | 84         | 83             | 84                  | <b>410</b> |
| E + ATC / M + CCA                   | 72                       | 46                              | 22                | 39         | 23             | 37                  | <b>167</b> |
| E + AGC / M + CCA                   | 87                       | 60                              | 42                | 54         | 58             | 50                  | <b>264</b> |
| E + ACA / M + CAC                   | 69                       | 43                              | 36                | 43         | 36             | 37                  | <b>195</b> |
| <b>TOTAL</b>                        | <b>328</b>               | <b>230</b>                      | <b>178</b>        | <b>220</b> | <b>200</b>     | <b>208</b>          |            |
| <b>MÉDIA</b>                        | <b>82</b>                | <b>57,5</b>                     | <b>44,5</b>       | <b>55</b>  | <b>50</b>      | <b>52</b>           |            |

Lerceteau e Szmidt (1999) relataram que existe uma relação direta entre o número de bases C/G nos iniciadores e no total de *locos* obtidos. Quanto maior o número de bases C/G presente nos iniciadores, menor o número de *locos* obtidos no gel. Todavia, para a Castanheira-do-Brasil esta relação não foi observada. A combinação E + AGC / M + CAT (três bases C/G) gerou maior número de *locos* que as outras combinações (E + ATC / M + CCA, E + AGC / M + CCA e E + ACA / M + CAC, com três, quatro e três bases C/G, respectivamente). Com relação ao número de *locos* polimórficos, a combinação E + AGC / M + CAT revelou 84 para as populações Parintins e Manaus Aeroporto, enquanto a combinação E + ATC / M + CCA revelou apenas 22 para a população Aruanã Brastor. Portanto, em castanheira-do-Brasil, a variação do número total de *locos* (69 a 100) e o número de *locos* polimórficos (22 a 84) não pode ser explicado como o resultado da composição nucleotídica da espécie em relação à quantidade de C/G. Uma vez que, combinações de iniciadores com igual número de C/G em sua composição geraram números diferentes de *locos*, a melhor combinação de oligonucleotídeos deve ser determinada para cada estudo, após a seleção para as combinações possíveis.

Os valores de polimorfismos através de marcadores AFLP encontrados foram mais altos quando comparados com outros marcadores moleculares dominantes, como o RAPD e codominantes como o de isoenzimas. Serra et al. (2006), estudando a diversidade genética em

acessos de 17 indivíduos de castanheira-do-Brasil oriundos dos Estados do Pará e Mato Grosso por meio de 51 oligonucleotídeos de RAPD, geraram um total de 144 *locos* polimórficos. A diferença de resultados é notável quando se compara os métodos utilizados para encontrar polimorfismo. Uma das evidências que se tem das análises realizadas é que a quantidade de fragmentos polimórficos gerados pela técnica AFLP foi suficiente para diferenciar as populações estudadas, indicando serem apropriados para a detecção de polimorfismo entre os acessos de castanheira-do-Brasil das populações analisadas.

## 5.4 Análise de dendrograma

### 5.4.1 Dentro de populações (Intrapopulacional)

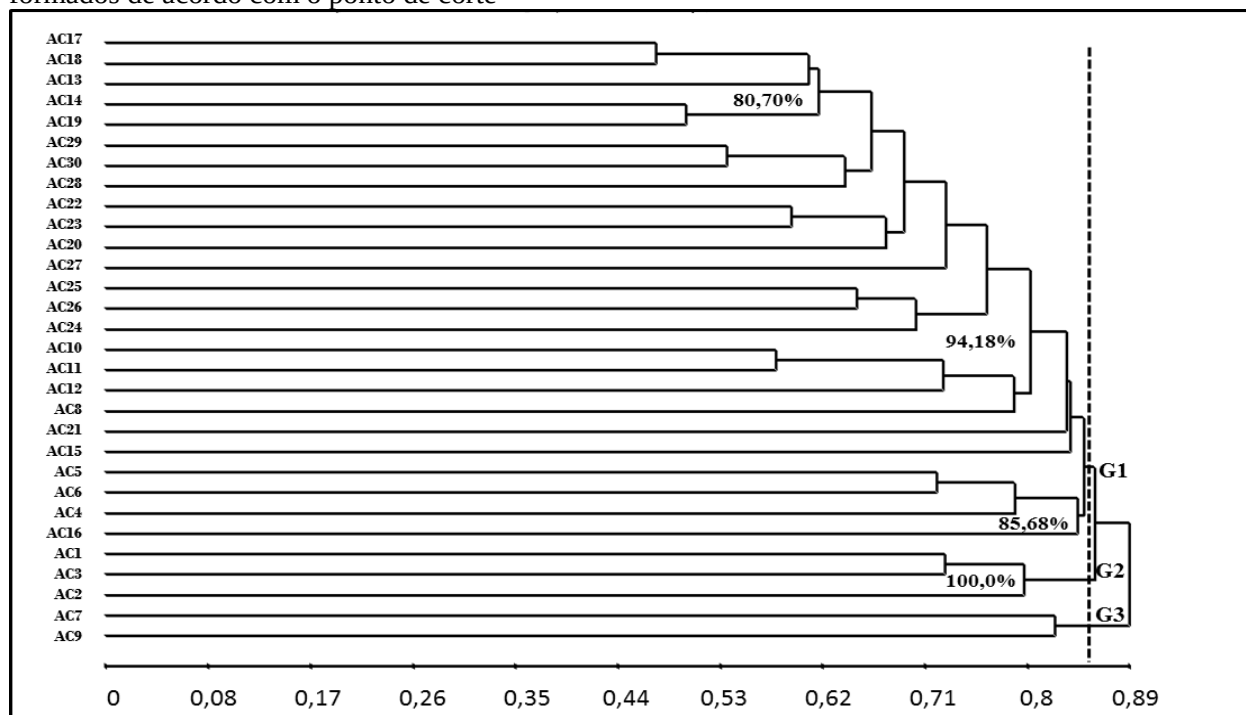
A construção de dendrogramas a partir do polimorfismo dos fragmentos obtidos é uma maneira de interpretar e caracterizar as relações de parentesco entre indivíduos. O agrupamento dos 150 indivíduos de castanheira-do-Brasil foi obtido pelo coeficiente de Jaccard. A população Aruanã Carolina apresentou três grupos, Aruanã Brastor, Manaus IFAM e Manaus Aeroporto apresentaram quatro grupos cada, e a população de Parintins apresentou seis grupos.

#### a) População Aruanã Carolina (AC) e Aruanã Brastor (AB)

A análise de agrupamento com base nas distâncias genéticas por meio do coeficiente de Jaccard, o ponto de corte entre os 30 acessos de AC analisados foi de 0,86, estimado pelo índice de Mojema e o dendrograma resultou em três grupos, onde o primeiro e maior grupo apresentou 25 acessos, o segundo grupo foi formado por três e o terceiro por dois acessos. Observou-se grande concentração dos indivíduos no grupo um, sugerindo que estes possuem um maior estreitamento genético que os demais (Figura 7). Os acessos mais divergentes foram AC2 e AC6 apresentando distância genética de 1,0, tornando-se assim, recomendados para cruzamento para a geração de futuros acessos segregantes e os mais similares foram AC17 e AC18 com 0,48 de distância genética (Anexo 1). No entanto, ao observarmos na matriz de dissimilaridade quando comparamos um acesso com todos os outros, o que obteve os maiores valores foi o acesso AC24

com os acessos AC8, AC11, AC13, AC14, AC15, AC17, AC18 e AC22. Portanto, o acesso AC24 tornou-se também um potencial genitor para cruzamentos visando gerar população segregante.

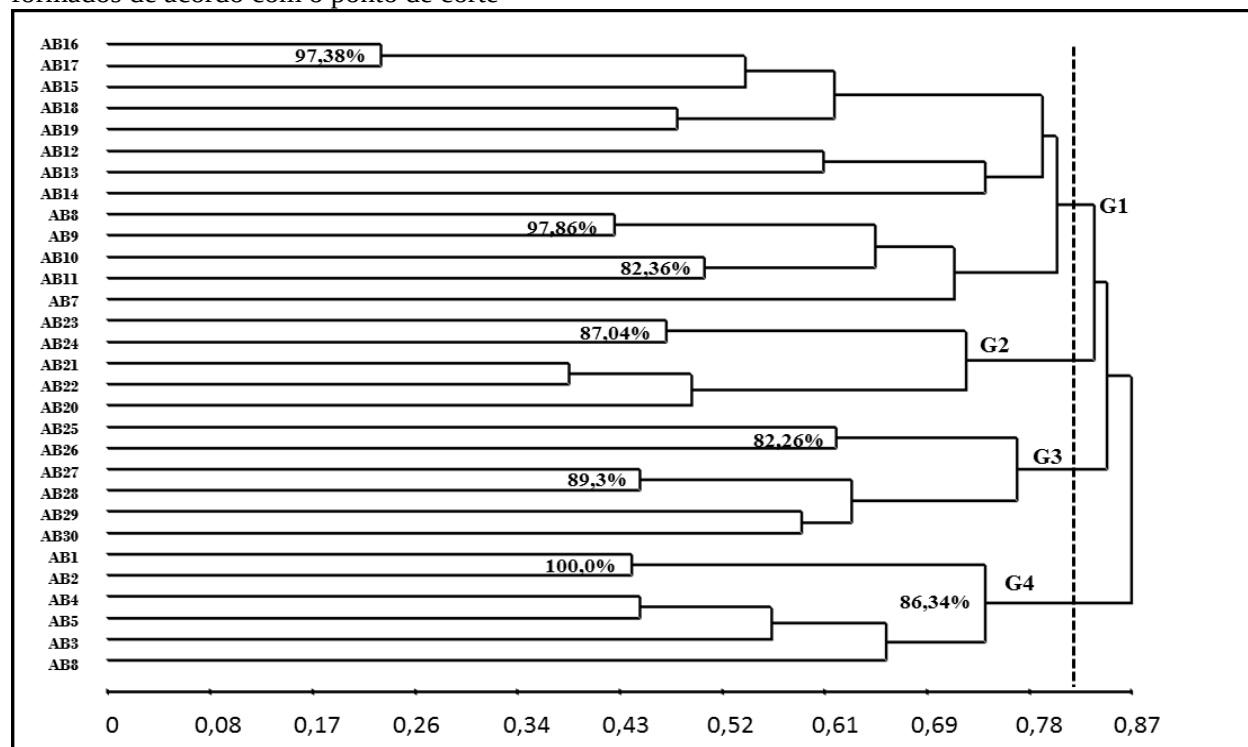
**Figura 7.** Dendrograma de dados binários de AFLP baseado no coeficiente de Jaccard para a população de Aruanã Carolina de castanheira-do-Brasil pelo método UPGMA; Os valores nos agrupamentos são os resultados mais elevados do *bootstrap* (5.000 reamostragens); G1, G2 e G3 são os agrupamentos formados de acordo com o ponto de corte



O ponto de corte para a população AB foi de 0,81 resultando em quatro grupos distintos, onde os acessos agruparam-se em número de treze no grupo um, cinco no grupo dois, seis no grupo três e seis no grupo quatro (Figura 8). No dendrograma, observou-se a dispersão dos acessos, apresentando assim, um perfil bem diferente da população AC, onde a maior parte dos acessos está em um único grupo. Portanto, notou-se que a diversidade genética na população Aruanã Brastor é maior que em Aruanã Carolina. Provavelmente as sementes dessas populações são oriundas de lugares diferentes. As estimativas de distância genética de Jaccard estão representadas na matriz de dissimilaridade, onde os acessos AB16 e AB17 apresentaram-se como os mais similares com 0,23 de distância genética e, AB3 e AB26, os mais dissimilares com 0,95 de distância genética seguido do acesso AB24 com os acessos AB7, AB10, AB11, AB12,

AB14, AB15, AB16 e AB17 tornando assim, recomendáveis para cruzamento nesta população (Anexo 2).

**Figura 8.** Dendrograma de dados binários de AFLP baseado no coeficiente de Jaccard para a população de Aruanã Brastor de castanheira-do-Brasil pelo método UPGMA; Os valores nos agrupamentos são os resultados mais elevados do *bootstrap* (5.000 reamostragens); G1, G2, G3 e G4 são os agrupamentos formados de acordo com o ponto de corte



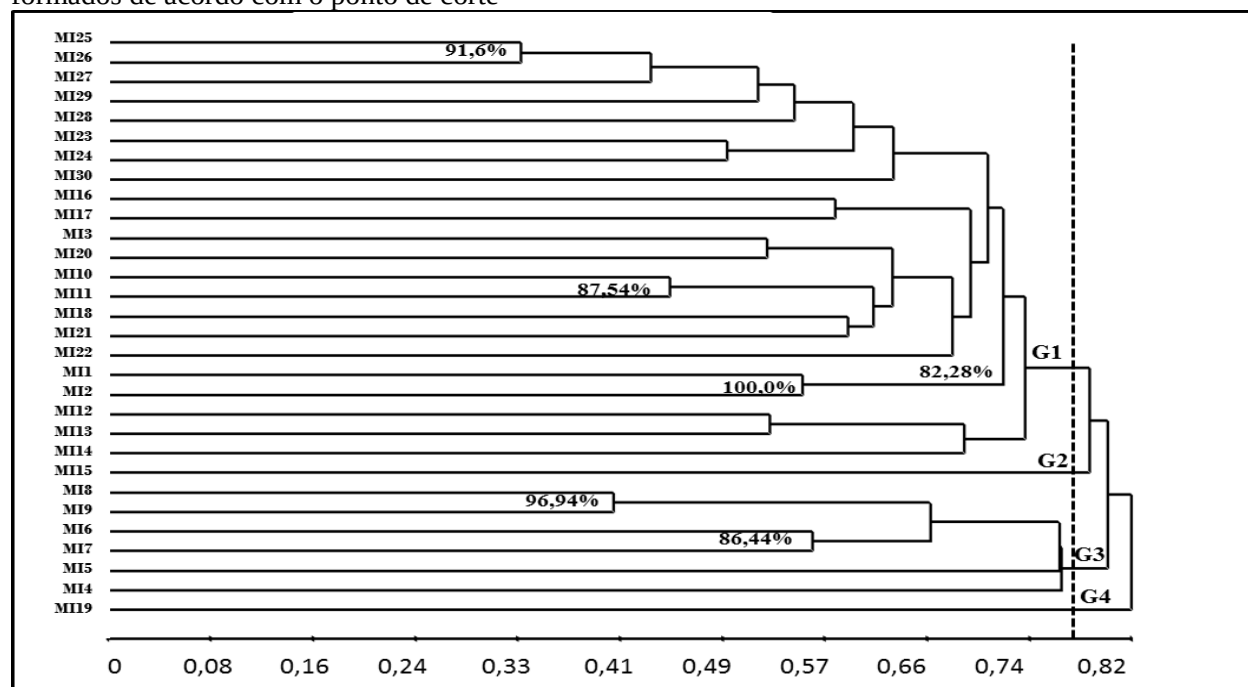
Estas duas populações encontram-se geograficamente mais próximas do que as outras populações, mas quanto à similaridade genética entre elas, nota-se a diferença na forma como os acessos estão distribuídos. Provavelmente, os acessos de cada uma dessas populações aqui estudados são originários de diferentes lugares.

#### b) População Manaus IFAM (MI)

A Figura 9 apresentou a população MI com um ponto de corte de 0,77 dividindo o dendrograma em quatro grupos, sendo o grupo um representado por 22 acessos, resultado que torna este agrupamento como o que tem maior estreitamento genético, os grupos dois e quatro

possuem apenas um único acesso cada, e o grupo três com seis acessos de um total de 30. Por meio do complemento aritmético do coeficiente de Jaccard, os acessos MI25 e MI26 com distância genética de 0,33 e, os acessos MI4 e MI16 com 0,91, mostraram-se os mais similares e dissimilares respectivamente, apresentando assim, esse último par como um potencial genitor para programas de melhoramento (Anexo 3). No entanto, a matriz de dissimilaridade mostra, também, ao compararmos um acesso com todos os outros acessos, o MI28 como o que obteve os maiores valores com os acessos MI15, MI20, MI21, MI23, MI24 e MI29. Portanto, o acesso MI28 torna-se também um potencial genitor para cruzamentos visando gerar populações segregantes.

**Figura 9.** Dendrograma de dados binários de AFLP baseado no coeficiente de Jaccard para a população de Manaus IFAM de castanheira-do-Brasil pelo método UPGMA; Os valores nos agrupamentos são os resultados mais elevados do *bootstrap* (5.000 reamostragens); G1, G2, G3 e G4 são os agrupamentos formados de acordo com o ponto de corte

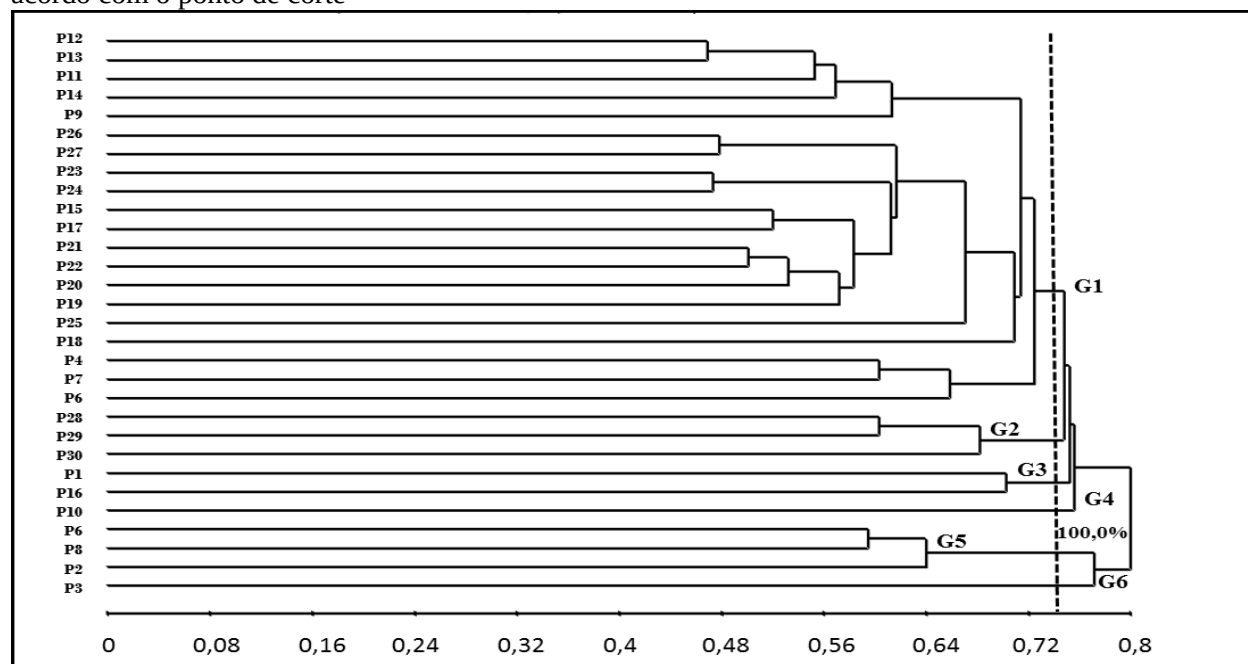


### c) População Parintins (P)

O agrupamento gerado a partir dos marcadores obtidos, com os oligonucleotídeos AFLP, apresentou a formação de seis grupos distintos, por meio do ponto de corte (0,75), onde o grupo

um é o maior grupo composto por 20 acessos, os grupos dois e cinco possuem três acessos cada, o grupo três com dois acessos e os grupos quatro e seis com um único acesso, cada (Figura 10). Na análise da matriz de dissimilaridade, os acessos P12 e P13 mostraram-se os mais similares com uma distância genética de 0,47 e, P8 e P25, os menos similares com 0,90 de distância genética, um para o outro (Anexo 4). Nesta população natural de castanheira-do-Brasil, recomendam-se os acessos P8 e P25 para cruzamento devido serem os mais distantes entre si, seguido pelo indivíduo P28 com os seguintes acessos: P17, P19, P20, P21, P22, P24 e P30.

**Figura 10.** Dendrograma de dados binários de AFLP baseado no coeficiente de Jaccard para a população de Parintins de castanheira-do-Brasil pelo método UPGMA; O valor no agrupamento é o resultado mais elevado do *bootstrap* (5.000 reamostragens); G1, G2, G3, G4, G5 e G6 são os agrupamentos formados de acordo com o ponto de corte

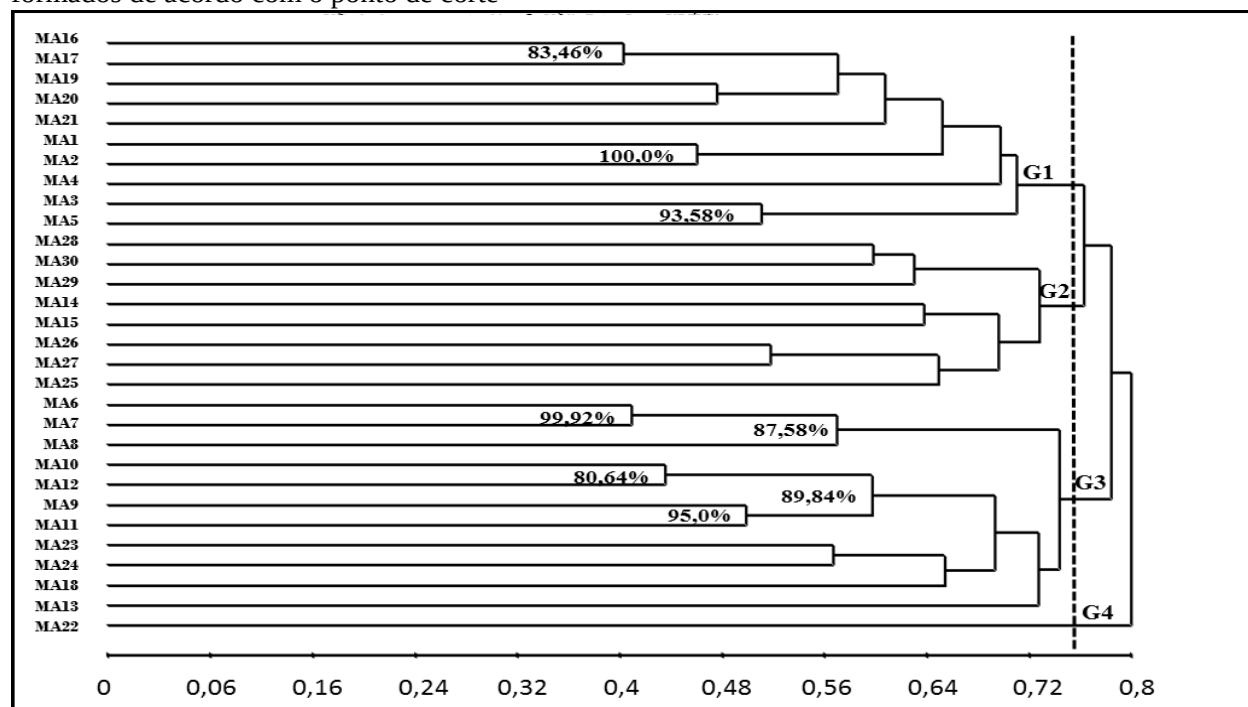


#### d) População Manaus Aeroporto (MA)

O dendrograma obtido a partir das estimativas de distância de Jaccard mostrou um ponto de corte com 0,75, separando assim, os acessos em quatro grupos: o primeiro com dez acessos, o segundo com oito, o terceiro com onze e o quarto com um único acesso (Figura 11). De acordo com o Anexo 5, a matriz de dissimilaridade apresentou os acessos MA16 e MA17 os mais similares e os acessos MA3 e MA12 os mais dissimilares seguido dos cruzamentos entre MA25

e MA6, MA25 e MA9, MA25 e MA13, MA25 e MA23, MA25 e MA24 e MA25 e MA28, tornando-os selecionados devido a alta divergência genética. Nesta população não houve uma diferença significativa nos três primeiros agrupamentos quanto ao número de acessos nestes grupos exceto no grupo quatro que apresentou apenas um acesso.

**Figura 11.** Dendrograma de dados binários de AFLP baseado no coeficiente de Jaccard para a população de Manaus Aeroporto de castanheira-do-Brasil pelo método UPGMA; Os valores nos agrupamentos são os resultados mais elevados do *bootstrap* (5.000 reamostragens); G1, G2, G3 e G4 são os agrupamentos formados de acordo com o ponto de corte



#### 5.4.2 Entre Populações (Interpopulacional)

Com base na similaridade genética de Nei, calculada para os 150 acessos de castanheira-do-Brasil analisados, verificou-se no dendrograma, dois grupos, onde o primeiro é composto por populações cultivadas (Aruanã Carolina, Aruanã Brastor e Manaus IFAM) e o segundo por populações naturais (Manaus Aeroporto e Parintins) (Figura 12). Utilizando dados de AFLP, estes variaram de 0,2862 para as populações mais relacionadas (AB e AC), a 0,4922 para as populações mais distantes (MA e AB) (Tabela 4).

**Figura 12.** Dendrograma de UPGMA interpopulacional de castanheira-do-Brasil, onde: AC = Aruanã Carolina; AB = Aruanã Brastor; MI = Manaus IFAM; MA = Manaus Aeroporto, calculado de acordo com o coeficiente de Nei. As partes hachuradas representa a divisão dos grupos

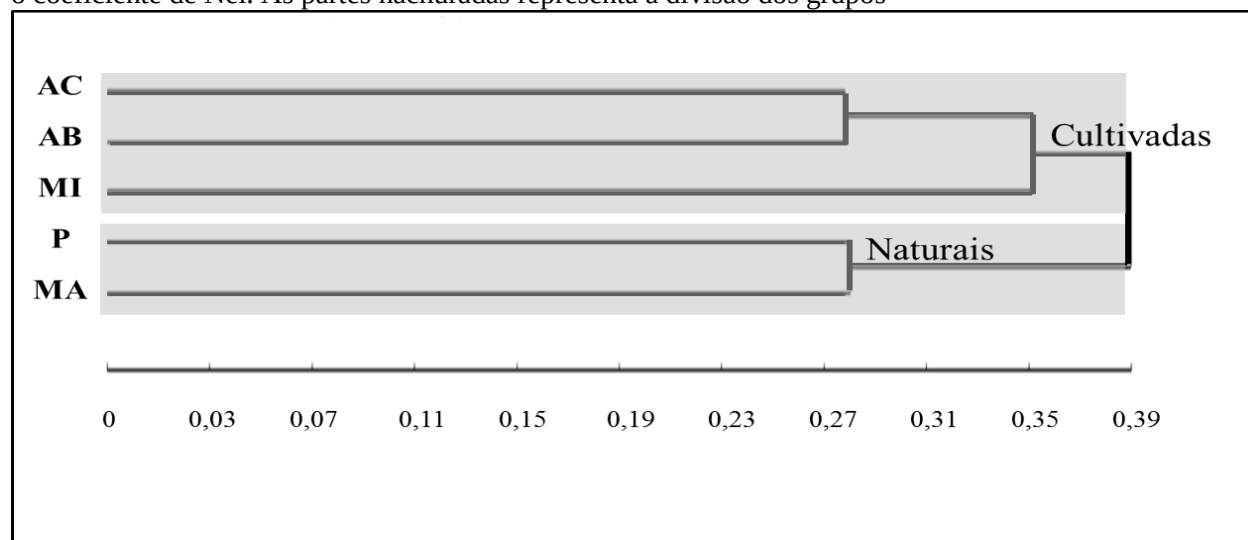


**Tabela 4.** Matriz de distância genética de Nei para as cinco populações de castanheira-do-Brasil

|                         | <b>Aruanã<br/>Carolina</b> | <b>Aruanã<br/>Brastor</b> | <b>Parintins</b> | <b>Manaus<br/>IFAM</b> | <b>Manaus<br/>Aeroporto</b> |
|-------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------|------------------------|-----------------------------|
| <b>Aruanã Carolina</b>  | -                          |                           |                  |                        |                             |
| <b>Aruanã Brastor</b>   | 0.2862                     | -                         |                  |                        |                             |
| <b>Parintins</b>        | 0.3973                     | 0.4290                    | -                |                        |                             |
| <b>Manaus IFAM</b>      | 0.4272                     | 0.2927                    | 0.3212           | -                      |                             |
| <b>Manaus Aeroporto</b> | 0.3374                     | 0.4922                    | 0.2884           | 0.4133                 | -                           |

De acordo com o dendrograma, entre as populações naturais e entre as cultivadas, existe algum grau de similaridade genética independente de procedência, diferenciando-se em parte, dos estudos de Serra et al. (2006), os quais indicaram dois agrupamentos de acordo com suas origens (Pará e Mato Grosso) e um grupo com a presença de similaridade genética entre ambos Estados, sendo os indivíduos do Pará provenientes de um banco de germoplasma e os indivíduos do Estado do Mato Grosso de um reflorestamento na cidade de Cláudia.

Vale ressaltar que os acessos desse trabalho foram do mesmo Estado e evidencia-se a separação do grupo das naturais e das cultivadas. Resultados semelhantes foram encontrados por

Kanashiro et al. (1997) estudando a diversidade genética entre 100 indivíduos de castanheira-do-Brasil provenientes de cinco regiões da Amazônia brasileira (Alenquer-PA, Altamira-PA, Marabá-PA, Santarém-PA e Rio Branco-AC), os quais apresentaram que os indivíduos da população de Santarém foram mais similares com os indivíduos de Rio Branco, a qual é geograficamente mais isolada e mais distante das outras populações.

O coeficiente de correlação cofenético (CCC) foi de 0,97 para as cinco populações, o qual revelou bom ajuste entre a representação gráfica das distâncias e a sua matriz original, possibilitando a realização de inferências por meio da avaliação visual da Figura 12. Neste tipo de representação gráfica, a eficiência com que a matriz original dos dados de distância é representada na figura implica diretamente na possibilidade de sua utilização.

De acordo com Barroso e Artes (2003) e Cruz e Carneiro (2003), o CCC nos mostra a confiabilidade da consistência do padrão de agrupamento tendo-se em mente que os valores próximos à unidade indicam maior consistência do padrão de agrupamento e devem ser os preferidos. O CCC menor que 0,7 indica inadequação do método de agrupamento (ROHLF, 2000). Existem casos em que a estrutura de agrupamento dos genótipos avaliados não atende a pressuposição hierárquica, por consequência outra forma de representação deverá ser adotada (BUSSAB et al., 1990), mesmo que sejam os mais recomendados para aplicação em dados biológicos (EVERITT, 1993).

Em termos de melhoramento genético, estudos indicam que o método hierárquico da distância média (UPGMA) é superior ao vizinho mais próximo e mais distante quando comparados com informações conhecidas da genealogia (SNEATH e SOKAL, 1973; ROMESBURG, 1984; DUDLEY, 1994). Segundo o resultado obtido para as populações de castanheira-do-Brasil foi possível constatar a alta consistência dos agrupamentos formados dando maior confiabilidade à análise do dendrograma interpopulacional.

Um dos fatores que, provavelmente, contribuiu para esta diversidade foi a alta densidade populacional apresentada pela espécie. Hamrick e Godt (1991) compararam a diversidade genética em espécies arbóreas tropicais comuns e raras e observaram a tendência das espécies comuns em apresentar maiores níveis de diversidade relativamente às espécies raras. A maior densidade de indivíduos pode permitir maior número de recombinações e múltiplas paternidades nas progênies, favorecendo ao aumento dos níveis de diversidade genética.

Outro fator para que a diversidade seja maior intrapopulacional que interpopulacional é o alcance restrito de dispersão que essas espécies apresentam concordando com Ducke (1946) quando afirmou que a distribuição de árvores de castanheira-do-Brasil é atribuída diretamente à intervenção do homem, já que as cutias, principais agentes dispersores desta espécie, não alcançam longas distâncias (PERES e BAIDER, 1997).

O conhecimento da diversidade genética existente nas populações é de fundamental importância para elucidar a biologia, conhecer a diversidade e obter informações sobre a evolução das espécies. A mutação, a recombinação e o fluxo gênico, na qualidade de forças que geram a variabilidade genética são fundamentais para o processo evolutivo, pois a adaptação de cada espécie ao longo das gerações depende da existência da diversidade sobre a qual a seleção natural possa atuar (BRAMMER, 1993). No melhoramento genético, estudos de diversidade genética têm importância fundamental para a escolha de genótipos a serem utilizados como genitores (CRUZ et al., 1994), o que aumenta a possibilidade de obtenção de indivíduos superiores nas populações segregantes. Esses autores afirmaram também que, além da divergência entre os progenitores, é fundamental considerar o mérito individual para as características que se tem interesse em melhorar.

Portanto, para obter ganhos em produtividade e qualidade dos frutos, recomenda-se o cruzamento entre os indivíduos da população Manaus Aeroporto e os da população Aruanã Brastor, os quais são promissores para incremento de variabilidade genética devido à maior distância genética encontrada entre as cinco populações.

### **5.5 Diversidade genética entre e dentro das populações**

Por meio dos resultados da AMOVA (Análise de Variância Molecular), com base nos 328 locos informativos, foi possível verificar que 48,1175% da diversidade genética é interpopulacional e 51,8825 % (Tabela 5), intrapopulacional, dando a entender que a manutenção de subpopulações desta espécie é uma estratégia importante para se preservar sua variabilidade genética natural. Esses resultados podem estar relacionados ao sistema de auto-incompatibilidade de pólen observado em castanheira-do-Brasil (CAVALCANTE, 2008), que induz a polinização cruzada e, conseqüentemente, o aumento do índice de polimorfismos de espécies de uma mesma

população, que indica uma forma de garantia da perpetuação da espécie com a maior variabilidade genética possível. Tais índices revelam que as populações podem estar isoladas. A diversidade genética mantida dentro e entre populações ocorre em função de eventos históricos e processos evolutivos recentes (LEE et al., 2002).

De acordo com Kageyama et al. (2003), este padrão de distribuição está de acordo com as espécies alógamas que possuem um eficiente mecanismo de dispersão de pólen e sementes (fluxo gênico). As habilidades dos indivíduos em trocar genes, associadas ao fluxo gênico entre populações, reduzem as diferenças entre populações por deriva genética e seleção, reduzindo a diversidade genética entre populações. Está de acordo também com Hamrick e Godt (1991) quando afirmaram que a maior parte da variação genética encontrada dentro das populações é uma das características observadas em estudos genéticos de populações tropicais. Segundo Loveless e Hamrick (1984), as espécies tipicamente alógamas apresentam alta variação genética dentro e pequena entre populações, no entanto, a divergência é reduzida de acordo com o aumento do fluxo gênico.

**Tabela 5.** Resultado da análise de variância molecular (AMOVA) para as cinco populações

| <b>Fonte de Variação</b> | <b>Graus de Liberdade</b> | <b>Soma dos Quadrados</b> | <b>Média dos Quadrados</b> | <b>Componentes da Variação</b> | <b>% da Variação</b> | <b>P</b> |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------|----------|
| Entre Populações         | 4                         | 3437,573                  | 859,3933                   | 27.6526                        | 48.1175              | <0,0001  |
| Dentro de Populações     | 145                       | 4323,367                  | 29,8163                    | 29.8163                        | 51.8825              | <0,0001  |
| <b>Total</b>             | <b>149</b>                | <b>7760,94</b>            | <b>52,0868</b>             | <b>57.4689</b>                 | <b>100,0</b>         |          |

---

**$F_{st} = 0,48$**

Espécies climáticas por suas características de vida longa, alta densidade populacional e altos níveis de cruzamento, provavelmente, apresentam fluxo gênico a longa distância com baixa divergência genética entre populações (KAGEYAMA et al., 2003). Gusson (2003), estudando o sistema reprodutivo e a estrutura genética de biribá (*Eschweilera ovata* [Cambess.] Miers), por meio da técnica de eletroforese de isoenzimas em três áreas de ocorrência natural de populações da espécie sob diferentes graus de antropização, sendo uma explorada e outras duas sem exploração, localizadas próximas à cidade de Salvador, mostrou que a divergência genética entre



**Tabela 7.** Resultado da análise de variância molecular (AMOVA) para as populações naturais (Parintins e Manaus Aeroporto)

| Fonte de Variação    | Graus de Liberdade | Soma dos Quadrados | Média dos Quadrados | Componentes da Variação | % da Variação | P       |
|----------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------------------|---------------|---------|
| Entre Populações     | 1                  | 4,3077             | 4,3077              | 0,1367                  | 39,9005       | <0,0001 |
| Dentro de Populações | 58                 | 11,9446            | 0,2059              | 0,2059                  | 60,0995       | <0,0001 |
| <b>Total</b>         | <b>59</b>          | <b>16,2524</b>     | <b>0,2755</b>       | <b>0,3427</b>           | <b>100,0</b>  |         |

$F_{st} = 0,39$

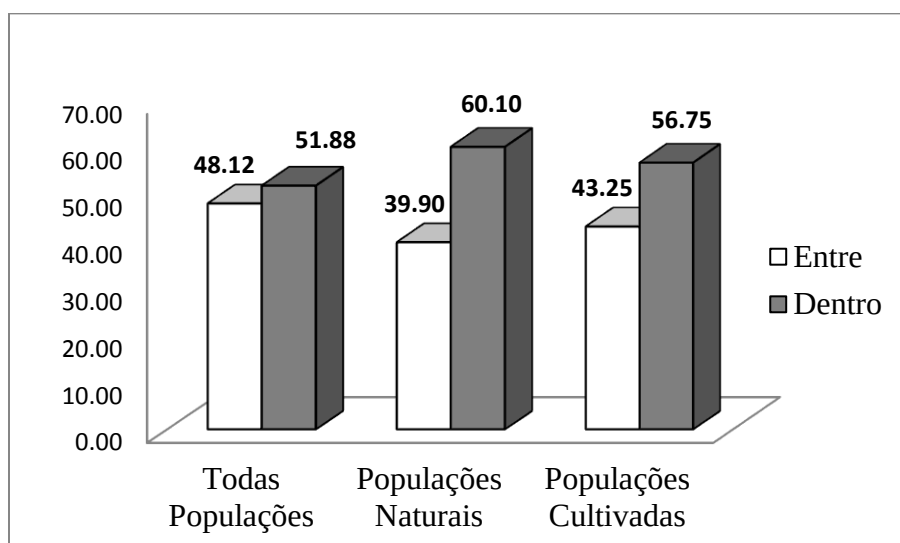


**Gráfico 1.** Valores da variação da diversidade genética para castanheira-do-Brasil em porcentagem de acordo com a AMOVA

Tais dados concordam com Scoles e Gribel (2011) e Shepard e Ramirez (2011), que juntos, realizaram um levantamento multidisciplinar que deixou poucas dúvidas. Eles colheram evidências que vão desde a biologia, com análises genéticas das populações de castanheira-do-Brasil, até a linguística, correlacionando diversos idiomas indígenas para decifrar a importância histórica da espécie para as populações da região. Uma das revelações mais importantes vem da análise do DNA ao comparar as populações de árvores em todas as partes da Amazônia, notou-se que há grande homogeneidade, ou seja, poucas diferenças genéticas de local para local. Isso indica que o espalhamento geográfico da castanheira-do-Brasil se deu rapidamente e em uma época relativamente recente, o que torna mais complicado imaginar um mecanismo natural para sua dispersão.

Analisando os valores de  $F_{st}$  encontrou-se 0,48 para as cinco populações, 0,39 para as populações naturais e 0,43 para as populações cultivadas (Gráfico 2), apresentando assim, um nível muito alto de diferenciação genética das populações. O  $F_{st}$  é a medida do grau de endocruzamento dentro de uma subpopulação em relação ao total da população e valores de  $F_{ST}$  entre 0 a 0,05 indicam baixa diferenciação genética; valores entre 0,05 a 0,15 evidenciam uma moderada diferenciação e valores entre 0,15 a 0,25 caracterizam alta diferenciação (WRIGHT, 1978). É provável que nas populações naturais ocorra uma alta taxa de endocruzamento entre os indivíduos devido seu valor de  $F_{st}$  ser menor que nas populações cultivadas, pois o endocruzamento reduz a frequência de heterozigotos aumentando proporcionalmente a frequência de homozigotos, e consequentemente reduzindo a variabilidade genética.

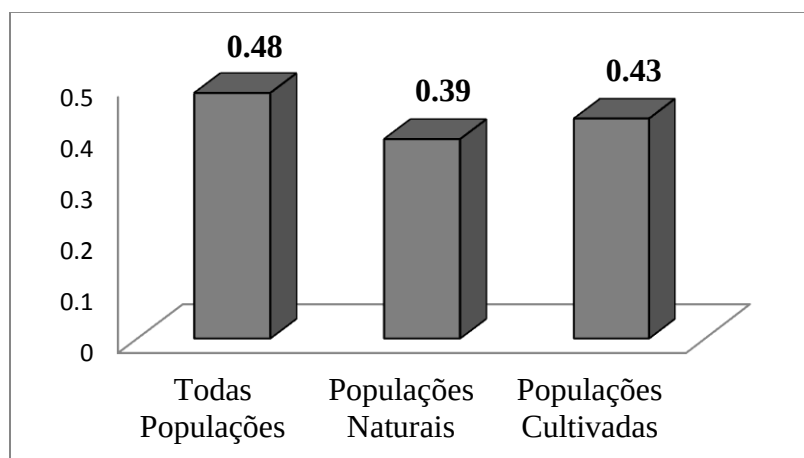


**Gráfico 2.** Valores de  $F_{st}$  de acordo com a AMOVA

Estes resultados adicionam novas informações sobre a diversidade genética de castanheira-do-Brasil, consequentemente contribuindo para o conhecimento genético desta espécie fornecendo subsídios para futuros programas de melhoramento genético e para programas de conservação e manejo florestal dessa espécie, uma vez que há escassez de relatos na literatura sobre trabalhos de diversidade genética dessa espécie utilizando marcadores AFLP, os quais permitem obter grande quantidade de marcas e alto desempenho na geração de dados.

## 6 CONCLUSÕES

1. O DNA extraído de castanheira-do-Brasil por meio do protocolo otimizado utilizando o detergente CTAB gerou amostras em quantidade e qualidade para a restrição com enzimas visando a análise de marcadores AFLP;
2. Os marcadores moleculares do tipo AFLP revelam alto conteúdo de informação genética em castanheira-do-Brasil e podem ser utilizados para análises genéticas visando obter informações para a sustentabilidade genética e o manejo florestal da espécie;
3. A distribuição da diversidade genética em populações naturais de castanheira-do-Brasil é a mesma observada na maioria das populações naturais de espécies arbóreas tropicais, sendo a diversidade genética maior dentro do que entre as populações;
4. A distribuição da variação genética nas populações cultivadas de castanheira-do-Brasil estudadas apresenta o mesmo padrão das populações naturais e as alterações na magnitude de valores são devidas ao efeito da seleção praticada para realização dos novos plantios.

## REFERÊNCIAS

- ARAS, S.; DURAN A.; YENILMEZ, G. Isolation of DNA for RAPD analysis from dry leaf material of some *Hesperis* L. specimens. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 21, p. 461a-461f, 2003.
- BARROSO, L.P.; ARTES, R. *Análise multivariada*. Lavras: UFLA, 151 p., 2003.
- BASSI, D.; SOARES, A. A. F.; OLIVEIRA-COLLET, S. A.; OLIVEIRA JR, R. S.; FREGONEZI, A. M. D. T.; MANGOLIN, C. A. Seleção de *primers* de RAPD para estudo da diversidade genética de *Conyza* sp. XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, Centro de Convenções - Ribeirão Preto – SP, p. 431–435, 2010.
- BAYMA, M. M. A. Castanha-do-Brasil: Cadeia produtiva se destaca no agronegócio acreano. Disponível em: [http://www.cpafac.embrapa.br/imprensa/artigos\\_tecnicos/artigos-de-midia-3/artigos-de-midia-2012/castanha-do-brasil-cadeia-produtiva-se-destaca-no-agronegocio-acreno/](http://www.cpafac.embrapa.br/imprensa/artigos_tecnicos/artigos-de-midia-3/artigos-de-midia-2012/castanha-do-brasil-cadeia-produtiva-se-destaca-no-agronegocio-acreno/). Acessado em: 31/05/2013.
- BORÉM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. *Domesticação e Melhoramento: Espécies Amazônicas*. Viçosa-MG, 486 p., 2009.
- BRAMMER, S. P. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de *Hordeum stenostachys* (Poaceae). Dissertação de Mestrado em Genética - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 264 p., 1993.
- BRANDÃO, V. Castanha-do-Brasil: A carne vegetal da Amazônia. Disponível em: [http://correiogourmand.com.br/info\\_03\\_dicionarios\\_gastronomicos\\_alimentos\\_nozes\\_sementes\\_castanha\\_brasil.htm](http://correiogourmand.com.br/info_03_dicionarios_gastronomicos_alimentos_nozes_sementes_castanha_brasil.htm). Acessado em: 26/10/2011.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 398 de 30 de abril de 1999. Regulamento técnico referente à informação sobre Alimentos Funcionais, 1999.
- BUCLKEY, D. P.; O'MALLEY, D. M.; APSIT, V.; PRANCE, G. T.; BAWA, K. S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl. – Lecythidaceae) 1. Genetic variation in natural populations. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 76, p. 923-928, 1988.
- BUSSAB, W. O.; MIAZAKI, E. S.; ANDRADE, D. F. *Introdução à análise de agrupamentos*. São Paulo: IME/USP, 105 p., 1990.
- CAMARGO, I.P. Estudos sobre propagação da castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa*). Lavras: UFLA, 127 p., 1997.
- CAVALCANTE, P. B. *Frutos comestíveis da Amazônia*. Museu Paraense Emilio Goeldi, Belém, 279 p., 1996.

CAVALCANTE, M. C. Visitantes florais e polinização da Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) em cultivo na Amazônia Central. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Fortaleza, 77 p., 2008.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Conjuntura mensal. Abril, 2012. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_05\\_17\\_15\\_27\\_18\\_conjunturacastanha\\_dobrasilabril2012.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_05_17_15_27_18_conjunturacastanha_dobrasilabril2012.pdf). Acessado em: 23/10/12.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. V. O. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 19, p. 299–306, 2001.

CRUZ, C. D.; CARVALHO, S. P. de; VENCOSKY, R. Estudos sobre divergência genética: fatores que afetam a predição do comportamento de híbridos. *Revista Ceres*, v.41, p.179-182, 1994.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, 585 p., 2003.

CRUZ, C. D. Programa Genes: análise multivariada e simulação. Viçosa: UFV, 175 p., 2013.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v. 19, p. 11-15, 1987.

DUCKE, A. Plantas de cultura pré-colombiana na Amazônia Brasileira. *Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Norte*, Belém, 24 p., 1946.

DUDLEY, J.W. Comparision of genetic distance estimators using molecular marker data. *In: Analysis of Molecular Marker Data. Joint Plant Breeding Symposia Series*, American Society for Horticultural Science, Crop Science Society of America, Corvallis, Oregon, 137 p., 1994.

EMBRAPA. Brasília, 2009. Disponível em: < <http://www.embrapa.br/> >. Acesso em: 12/06/12.

ENRÍQUEZ, G. Amazônia: Rede de Inovação de Dermocosméticos: Sub-rede de dermocosméticos na Amazônia a partir do uso sustentável de sua biodiversidade com enfoques para as cadeias produtivas da castanha-do-pará e dos óleos de andiroba e copaíba. Brasília - DF, v.14. n. 28.p 51-118, 2009.

EVERITT, B. S. Cluster analysis. Cambridge, University Press, 170 p., 1993.

FERNANDES, E. T. M. B. Diversidade morfológica e produção de *Bertholletia excelsa* H. B. K. (Lecythidaceae) no sudeste do estado do Acre. Dissertação de Mestrado em Ecologia e Manejo de Recursos Naturais – Universidade Federal do Acre – Rio Branco, 45 p., 2007.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220 p., 1998.

FRAGA, C. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 26 p. 235-244, 2005.

GUSSEON, E. Uso e diversidade genética em populações naturais de biribá (*Eschweilera ovata* Miers): Subsídios ao manejo e conservação da espécie. Piracicaba - SP, 107 p., 2003.

HAMRIC, J. L.; GODT, M. J. Allozyme diversity in plant species. *In*: BROWN, A.H.D; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L.; WEIR, B. S. (Ed.) *Plant populations genetics, breeding and germplasm resources*, Sunderland, Mass: Sinauer Associates, p. 43-63, 1991.

HAYASHIDA-OLIVER, Y.; BOOT, R. G. A.; POORTER, L. Influencia de la disponibilidad de agua y luz en el crecimiento y la morfología de plantines de *Swietenia macrophylla*, *Cedrela odorata* e *Bertholletia excelsa*. *Ecología en Bolivia*, v. 35, p. 51-60, 2001.

JANZEN, D. H. Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. *Science*, v. 171, p. 203-205, 1971.

KAGEYAMA, P. K.; GANDARA, F. B. Recuperação de áreas degradadas. *In*: RODRIGUES, R. R. (Ed.) *Matas Ciliares: conservação e recuperação*, São Paulo, p. 249-269, 2000.

KAGEYAMA, P. K.; LEPSCH-CUNHA, N. M. Singularidade da biodiversidade nos trópicos. *In*: GARAY, I.; DIAS, B. F. S. (Ed.) *Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais*. Petrópolis: Editora Vozes, p. 199-214, 2001.

KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.; RIBAS, L. A.; GANDARA, F. B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M. B.; VENCovsky, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. *Scientia Forestalis*, n. 64, p. 93-107, 2003.

KAINER, K. A.; WADT, L. H.; STAUDHAMMER, C. L. Explaining variation in Brazil nut fruit production. *Forest Ecology and Management*, p. 30-43, 2007.

KANASHIRO, M; HARRIS, S. A.; SIMONS, A. RAPD Diversity in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. e Bompl., Lecythidaceae). *Silvae Genetica*, v. 46, n. 4, p. 185-252, 1997.

LEE, S. L.; NG, K. K. S.; NORWATI, A.; SALWANA, M. H. S.; LEE, C. T.; NORWATI, M. Population genetics of *Intsia palembanica* (Leguminosae) and genetic conservation of Virgin Jungle Reserves in Peninsular Malaysia. *American Journal of botany*, St. Louis, v.89, p.447-459, 2002.

LERCETEAU, E.; SZMIDT, A. E. Properties of AFLP markers in inheritance and genetic diversity studies of *Pinus sylvestris* L. *Heredity*, n. 82, p. 252-260, 1999.

LOCATELLI, M.; VIEIRA, A. H.; GAMA, M. M. B.; FERREIRA, M. G. R.; MARTINS, E. P.; SILVA FILHO, E. P.; SOUZA, V. F.; MACEDO, R. S. Cultivo da Castanha-do-Brasil em Rondonia, 2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Castanha/CultivodaCastanhadoBrasilRO/autores.htm>. Acessado em 27/06/2011.

LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A. V. O.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C.; CARNEIRO, M. S. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP): aspectos técnicos e interpretação genética. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, p. 64-68, 2002.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v. 1, 384 p., 2002.

LOUREIRO, A. A.; SILVA, M. E.; ALENCAR, J. C. Essências madeireiras da Amazônia. INPA. v. 1, p. 121-125, 1979.

LOVELESS, M. D.; HAMRICH, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual review of ecology and systematics*, Palo Alto, v.15, p. 65-95, 1984.

MAUÉS, M. M. Reproductive phenology and pollination of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.) in eastern Amazonian. In: KEVAN P; IMPERATRIZ F. (Eds.) - Pollinating Bees - The Conservation Link Between Agriculture and Nature - Ministry of Environment / Brasília, p. 245-254, 2002.

MYERS, G.; NEWTON A. C.; MELGAREJO, O. The influence of canopy gap size on natural regeneration of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) in Bolivia. *Forest Ecology and Management*, v. 127(1-3), p. 119-128, 2000.

MORI, S. A. e PRANCE, G. T. Taxonomy, ecology and economic botany of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. e Bonpl.: Lecythidaceae). *Advances in Economic Botany*, New York: The New York Botanical Garden, v.8, p.130-150, 1990.

MORITZ, A. Estudos biológicos da floração e frutificação da Castanha do Brasil. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 20 p., 1984.

MÜLLER, K. E.; VIEIRA, F. S. Diversidade genética dentro e entre populações de *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. por meio de marcadores iSSR. *Anais Vol. 6, Congresso de Iniciação Científica, Cáceres/MT*, v. 6, cód. 1256, 2010.

MÜLLER, C. H., CARVALHO, J. E. U.; FIGUEIREDO, F. J. C.; KATO, A. K.; STEIN, R. L. T. SILVA, A. B. A Cultura da Castanha-do-Brasil. EMBRAPA Centro de Pesquisa da Amazônia Oriental, Brasília, Coleção Plantar, 25 p., 1995.

OHASHI, S. T.; DANIEL, O.; COSTA, L. G. S. A Castanha-do-Brasil – *Bertholletia excelsa*, H.B.K. Belém: FCAP, 17 p., 1995.

OLIVEIRA, M. S. P.; AMORIM, E. P.; SANTOS, J. B.; FERREIRA, D. F. Diversidade genética entre acessos de açaizeiro baseada em marcadores RAPD. *Ciência e agrotecnologia*, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1645-1653, 2007.

O'MALLEY, D. M.; BUCKLEY, D. P.; PRANCE, G. T.; BAWA, K. S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl. – Lecythidaceae) 2. Mating System. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 76, n. 6, p. 929-932, 1988.

PAMPLONA, E. S. B. Variabilidade genética em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) em solo de terra firma da Amazônia brasileira, 80 p., 2000.

PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; DUTRA, L. F. Aplicações no Melhoramento Genético de Plantas. UFPA – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 127 p., 2001.

PEÑA-CLAROS, M. R. G. A.; BOOT, J.; DORADO L.; ZONTA, A. Enrichment planning of *Bertholletia excelsa* in secondary forest in the Bolivian Amazon: effect of cutting line width on survival, growth and crown traits. *Forest Ecology and Management*, 161(1-3): 159-168, 2002.

PERES, C. A.; BAIDER, C. Seed dispersal, spatial distribution and population structure of Brazil nut trees (*Bertholletia excelsa*) in southeastern Amazonia. *Journal of Tropical Ecology*, v. 13, p. 395-616, 1997.

PEREZ, C. A.; BAIDER, C.; ZUIDEMA, P. A.; WADT, L. H. O.; KAINER, K. A.; GOMES-SILVA, D. A. P.; SALOMÃO, R. P.; SIMÕES, L. L.; FRANCIOSI, E. R. N.; VALVERDE, F. C.; GRIBEL, R.; SHEPARD Jr, G. H.; KANASHIRO, M.; COVENTRY, P.; YU, D. W.; WATKINSON, A. R.; FRECKLETON, R. P. Demographic Threats to the Sustainability of Brazil Nut Exploitation. Vol. 302 SCIENCE, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org>> Acessado em: 19/03/2012.

PHILIPS, K.; RUGGIO, D. M.; ASHRAF-KHORASSANI, M. Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 24, p. 9436-9445, 2005.

RAJORA, O. P.; PLUHAR, S. A. Genetic diversity impacts of forest fire, forest harvesting, and alternative reforestation practices in black spruce (*Picea mariana*), Berlin, v. 106, p.1203-1212, 2003.

REILY, C. Selenium in food and health. Springer: United States of America, p. 158-172, 2006.

REIS, C. A. F.; FILHO, E. P. Estado da arte de plantios com espécies florestais de interesse para o Mato Grosso [recurso eletrônico]. Embrapa Florestas, 2011. Documentos, Embrapa Florestas ISSN 1990;3958, 215. Site: <http://www.cnpf.embrapa.br/publica/seriedoc/edicoes/doc215.pdf>.

ROHLF, F. J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. New York: Exeter Software, 83 p., 2000.

ROMESBURG, H. C. Cluster analysis for researchers. Califórnia, Lifetime Learning, 334 p., 1984.

RESENDE, M. D. V. Seleção genética computadorizada: manual do usuário. Selegen-Reml/Blup - Colombo: Embrapa – CNPF, 975 p., 2002.

SALOMÃO, R. P. Estrutura e densidade de *Bertholletia excelsa* H. B. K. (castanheira) nas regiões de Carajás e Marabá, estado do Pará. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Série Botânica*, Belém, v. 7, n. 1, p. 47-68, 1991.

SCOLES, R.; GRIBEL, R. Population structure of Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*, Lecythidaceae) stands in two areas with different occupation histories in the Brazilian Amazon. *Human Ecology*. v. 39, p. 455- 464, 2011.

SERRA, A. G. P.; PAIVA, R.; PAIVA, E.; NOGUEIRA, R. C.; SOARES, F. P.; PAIVA, P. D. O. Estudo da divergência genética em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) utilizando marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), Cruz das Almas – BA, v. 18, n. 1, p. 42-47, 2006.

SHEPARD Jr., G. H. e RAMIREZ, H. “Made in Brazil”: human dispersal of the Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*, Lecythidaceae) in Ancient Amazonia. *Economic Botany*. v. 65 (1), p. 44-65, 2011.

SIBINELLI, V. Castanha, de onde? Disponível em: <http://www.terradagente.com.br/biblioteca/NOT,0,0,281982,Castanha+de+onde.aspx>. Acessado em: 24/10/12.

SILVA, M. F. F.; ROSA, N. A. Estudos botânicos na área do projeto Ferro Carajás, Serra Norte – PA. In: Simpósio do Trópico Úmido, Belém, v.2, p.167-70, 1986.

SILVA, P. T. E.; BRIENZA Jr. S.; VALE, R. S.; BARROS, P. L. C.; CASTILHO, M. T. F. Potencial de utilização da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) em sistemas agroflorestais na Amazônia brasileira. In: Congresso Brasileiro De Sistemas Agroflorestais, 7., Brasília – DF, EMATER – DF: EMBRAPA, 2009.

SIMÕES, A. V. Impactos de tecnologias alternativas e do manejo da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, HUMB. e BONPL., 1808) no controle da contaminação por aflatoxinas em sua cadeia produtiva. UFAM: FCA, 62 p., 2004.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. Numerical taxonomy. San Francisco, W. R. Freeman, 573 p., 1973.

SOUZA, I. F. Cadeia produtiva de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) no Estado de Mato Grosso. Universidade de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 142 p., 2006.

SOUZA, C. R.; AZEVEDO, C. P.; ROSSI, L. M. B.; LIMA, R. M. B. Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.) Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, Documento 60, 28 p., 2008.

SUJII, O. S.; AZEVEDO, V. C. R.; CIAMPI, A. Y.; WADT, L. H. O. Diferenciação de dois tipos de castanheiras-do-brasil por meio de marcadores moleculares. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, Brasília, DF. Anais... Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 569 p., 2008.

SWAINE, M. D.; WHITMORE, T. C. On the definition of ecological species groups in tropical rain forest. *Vegetation*, v. 75, p. 81-86, 1988.

TAVARES, M. F. F. Agregação de valor na castanha-do-brasil: o caso da natura ekos. ESPM – Cetral de Cases, 16 p., 2010.

TRUCOM, C. A Castanha do Pará. Disponível em: <http://www.docelimao.com.br/site/linhaca/537-a-castanha-do-para.html>. Acessado em: 16/04/12.

VILHENA, M. R. Ciência, Tecnologia e Desenvolvimento na Economia da Castanha-do-Brasil. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Política Científica e Tecnológica), Instituto de Geociências, Campinas, Universidade Estadual de Campinas-SP, 149 p., 2004.

VOS, P.; HOGERS, K.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRIGTRS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZAPEAU, M.; AFLP: a new technique for DNA fringerprinting. Nucleics Acids Research, London, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WADT, L. H. O; KAINER, K. A; GOMES-SILVA, D. A. P. Population structure and nut yield of a *Bertholletia excelsa* stand in Southwestern Amazonia. Forest Ecology and Management, Amsterdam, v. 211, p. 371-384, 2005.

WRIGHT, S. Evolution and genetic population. Variability within and among natural populations. Chicago III: University of Chicago Press. v. 4, 590p, 1978.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. LWT – Food Science and Technology, v. 4, n. 10, p. 3509-3527, 2009.

ZORÓ, RIKBAKTISA e ARARA. Boas Práticas de Coleta, Armazenamento e Comercialização da castanha-do-Brasil: Capacitação e intercâmbio de experiências entre os povos da Amazônia mato-grossense com manejo de produtos florestais não madeireiros. Projeto de Conservação e Uso Sustentável da Biodiversidade das Florestas do Nordeste de Mato Grosso – Programa Integrado da Castanha - PIC. Cuiabá-MT. Defanti Editora, 42 p., 2008.

ZUIDEMA, P. A.; DIJKMAN, W.; VAN RIJSOORT, J. Crecimiento de plantines de *Bertholletia excelsa* H.B.K. en función de su tamaño y la disponibilidad de luz. Ecología en Bolivia, v. 33, p. 23-36, 1999.

ZUIDEMA, P. A. Demography and management of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa*). Riberalta: PROMAB, (Promab Scientific Series, n.6), 111 p., 2003.

**Anexo 1.** Matriz de dissimilaridade de *locos* AFLP de acessos de Castanheira-do-Brasil originários de Aruanã Carolina (Itacoatiara – AM)

|             | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19   | 20   | 21   | 22   | 23   | 24   | 25   | 26   | 27   | 28   | 29   | 30 |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|
| <b>AC1</b>  | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC2</b>  | 0,82 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC3</b>  | 0,73 | 0,79 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC4</b>  | 0,89 | 0,91 | 0,84 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC5</b>  | 0,84 | 0,86 | 0,81 | 0,79 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC6</b>  | 0,89 | 1,00 | 0,91 | 0,80 | 0,72 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC7</b>  | 0,90 | 0,90 | 0,86 | 0,90 | 0,86 | 0,90 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC8</b>  | 0,90 | 0,90 | 0,83 | 0,90 | 0,86 | 0,90 | 0,83 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC9</b>  | 0,90 | 0,85 | 0,84 | 0,90 | 0,91 | 0,86 | 0,83 | 0,90 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC10</b> | 0,77 | 0,89 | 0,82 | 0,87 | 0,81 | 0,91 | 0,91 | 0,76 | 0,87 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC11</b> | 0,78 | 0,87 | 0,78 | 0,79 | 0,8  | 0,88 | 0,88 | 0,87 | 0,86 | 0,58 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC12</b> | 0,81 | 0,88 | 0,84 | 0,95 | 0,91 | 0,94 | 0,83 | 0,85 | 0,9  | 0,74 | 0,72 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC13</b> | 0,82 | 0,87 | 0,87 | 0,90 | 0,76 | 0,88 | 0,85 | 0,85 | 0,94 | 0,75 | 0,75 | 0,80 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC14</b> | 0,81 | 0,92 | 0,84 | 0,83 | 0,72 | 0,72 | 0,88 | 0,84 | 0,93 | 0,72 | 0,78 | 0,80 | 0,58 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC15</b> | 0,85 | 0,86 | 0,83 | 0,9  | 0,87 | 0,90 | 0,92 | 0,86 | 0,86 | 0,80 | 0,80 | 0,79 | 0,83 | 0,85 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC16</b> | 0,95 | 0,88 | 0,86 | 0,87 | 0,81 | 0,87 | 0,94 | 0,92 | 0,94 | 0,93 | 0,92 | 0,94 | 0,86 | 0,78 | 0,91 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC17</b> | 0,81 | 0,82 | 0,82 | 0,83 | 0,71 | 0,88 | 0,88 | 0,84 | 0,90 | 0,80 | 0,76 | 0,85 | 0,67 | 0,71 | 0,86 | 0,73 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC18</b> | 0,79 | 0,87 | 0,82 | 0,81 | 0,68 | 0,80 | 0,85 | 0,75 | 0,88 | 0,71 | 0,72 | 0,81 | 0,55 | 0,50 | 0,83 | 0,71 | 0,48 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC19</b> | 0,84 | 0,91 | 0,87 | 0,83 | 0,78 | 0,74 | 0,91 | 0,86 | 0,87 | 0,76 | 0,77 | 0,77 | 0,66 | 0,50 | 0,78 | 0,78 | 0,71 | 0,56 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC20</b> | 0,86 | 0,91 | 0,86 | 0,86 | 0,84 | 0,89 | 0,89 | 0,84 | 0,93 | 0,78 | 0,74 | 0,82 | 0,65 | 0,67 | 0,84 | 0,87 | 0,8  | 0,66 | 0,62 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC21</b> | 0,79 | 0,86 | 0,92 | 0,89 | 0,83 | 0,89 | 0,89 | 0,84 | 0,87 | 0,82 | 0,85 | 0,85 | 0,84 | 0,84 | 0,89 | 0,93 | 0,88 | 0,77 | 0,83 | 0,80 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC22</b> | 0,80 | 0,81 | 0,84 | 0,90 | 0,80 | 0,90 | 0,86 | 0,75 | 0,95 | 0,73 | 0,76 | 0,73 | 0,61 | 0,70 | 0,81 | 0,82 | 0,67 | 0,6  | 0,70 | 0,63 | 0,77 | -    |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC23</b> | 0,80 | 0,80 | 0,87 | 0,80 | 0,80 | 0,89 | 0,87 | 0,82 | 0,89 | 0,70 | 0,70 | 0,73 | 0,71 | 0,75 | 0,79 | 0,88 | 0,70 | 0,66 | 0,73 | 0,73 | 0,79 | 0,60 | -    |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC24</b> | 0,91 | 0,98 | 0,92 | 0,89 | 0,84 | 0,89 | 0,91 | 0,95 | 0,87 | 0,91 | 0,93 | 0,92 | 0,87 | 0,87 | 0,92 | 0,94 | 0,87 | 0,83 | 0,82 | 0,83 | 0,90 | 0,81 | 0,82 | -    |      |      |      |      |      |    |
| <b>AC25</b> | 0,87 | 0,95 | 0,89 | 0,88 | 0,74 | 0,82 | 0,94 | 0,91 | 0,86 | 0,81 | 0,84 | 0,87 | 0,73 | 0,69 | 0,84 | 0,86 | 0,77 | 0,70 | 0,66 | 0,73 | 0,85 | 0,72 | 0,72 | 0,66 | -    |      |      |      |      |    |
| <b>AC26</b> | 0,80 | 0,98 | 0,90 | 0,86 | 0,82 | 0,78 | 0,95 | 0,86 | 0,90 | 0,79 | 0,77 | 0,84 | 0,78 | 0,69 | 0,86 | 0,95 | 0,76 | 0,72 | 0,76 | 0,83 | 0,89 | 0,72 | 0,82 | 0,75 | 0,65 | -    |      |      |      |    |
| <b>AC27</b> | 0,89 | 0,96 | 0,95 | 0,98 | 0,91 | 0,92 | 0,94 | 0,84 | 0,94 | 0,83 | 0,89 | 0,83 | 0,76 | 0,71 | 0,89 | 0,88 | 0,87 | 0,74 | 0,64 | 0,71 | 0,83 | 0,76 | 0,85 | 0,87 | 0,73 | 0,83 | -    |      |      |    |
| <b>AC28</b> | 0,81 | 0,90 | 0,81 | 0,88 | 0,81 | 0,88 | 0,91 | 0,85 | 0,91 | 0,79 | 0,80 | 0,79 | 0,71 | 0,73 | 0,85 | 0,79 | 0,69 | 0,62 | 0,70 | 0,74 | 0,90 | 0,70 | 0,72 | 0,84 | 0,69 | 0,73 | 0,70 | -    |      |    |
| <b>AC29</b> | 0,84 | 0,95 | 0,89 | 0,95 | 0,87 | 0,94 | 0,89 | 0,89 | 0,97 | 0,78 | 0,81 | 0,81 | 0,64 | 0,73 | 0,86 | 0,91 | 0,68 | 0,65 | 0,75 | 0,75 | 0,86 | 0,61 | 0,75 | 0,84 | 0,70 | 0,70 | 0,70 | 0,66 | -    |    |
| <b>AC30</b> | 0,83 | 0,94 | 0,89 | 0,88 | 0,81 | 0,85 | 0,90 | 0,86 | 0,96 | 0,81 | 0,82 | 0,87 | 0,70 | 0,62 | 0,90 | 0,78 | 0,60 | 0,59 | 0,60 | 0,70 | 0,85 | 0,71 | 0,81 | 0,82 | 0,70 | 0,69 | 0,62 | 0,63 | 0,54 | -  |

**Anexo 2**, Matriz de dissimilaridade de *locos* AFLP de acessos de Castanheira-do-Brasil originários de Aruanã Brastor (Itacoatiara – AM)

|             | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19   | 20   | 21   | 22   | 23   | 24   | 25   | 26   | 27   | 28   | 29   | 30 |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|
| <b>AB1</b>  | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB2</b>  | 0,44 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB3</b>  | 0,70 | 0,56 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB4</b>  | 0,78 | 0,70 | 0,50 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB5</b>  | 0,80 | 0,76 | 0,63 | 0,45 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB6</b>  | 0,83 | 0,82 | 0,78 | 0,72 | 0,48 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB7</b>  | 0,86 | 0,92 | 0,94 | 0,90 | 0,81 | 0,70 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB8</b>  | 0,91 | 0,90 | 0,86 | 0,85 | 0,82 | 0,80 | 0,68 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB9</b>  | 0,92 | 0,89 | 0,87 | 0,83 | 0,80 | 0,80 | 0,74 | 0,43 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB10</b> | 0,86 | 0,85 | 0,84 | 0,85 | 0,80 | 0,82 | 0,70 | 0,66 | 0,59 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB11</b> | 0,85 | 0,89 | 0,88 | 0,89 | 0,82 | 0,82 | 0,75 | 0,68 | 0,67 | 0,50 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB12</b> | 0,87 | 0,89 | 0,85 | 0,88 | 0,85 | 0,81 | 0,78 | 0,69 | 0,68 | 0,64 | 0,61 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB13</b> | 0,83 | 0,87 | 0,90 | 0,91 | 0,91 | 0,91 | 0,89 | 0,83 | 0,89 | 0,83 | 0,73 | 0,61 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB14</b> | 0,87 | 0,90 | 0,90 | 0,95 | 0,88 | 0,82 | 0,87 | 0,91 | 0,93 | 0,84 | 0,82 | 0,78 | 0,71 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB15</b> | 0,90 | 0,93 | 0,93 | 0,93 | 0,91 | 0,89 | 0,84 | 0,87 | 0,88 | 0,81 | 0,78 | 0,84 | 0,82 | 0,65 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB16</b> | 0,89 | 0,89 | 0,90 | 0,88 | 0,87 | 0,82 | 0,87 | 0,84 | 0,84 | 0,80 | 0,82 | 0,74 | 0,83 | 0,82 | 0,52 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB17</b> | 0,90 | 0,91 | 0,89 | 0,91 | 0,92 | 0,87 | 0,85 | 0,79 | 0,81 | 0,77 | 0,79 | 0,68 | 0,79 | 0,82 | 0,55 | 0,23 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB18</b> | 0,92 | 0,93 | 0,89 | 0,88 | 0,84 | 0,81 | 0,82 | 0,78 | 0,80 | 0,81 | 0,81 | 0,78 | 0,87 | 0,84 | 0,72 | 0,62 | 0,48 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB19</b> | 0,93 | 0,92 | 0,90 | 0,90 | 0,82 | 0,80 | 0,82 | 0,76 | 0,76 | 0,77 | 0,79 | 0,69 | 0,87 | 0,86 | 0,77 | 0,59 | 0,51 | 0,48 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB20</b> | 0,90 | 0,86 | 0,77 | 0,82 | 0,75 | 0,75 | 0,88 | 0,76 | 0,81 | 0,80 | 0,81 | 0,76 | 0,87 | 0,89 | 0,80 | 0,62 | 0,65 | 0,69 | 0,54 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB21</b> | 0,91 | 0,89 | 0,82 | 0,83 | 0,77 | 0,77 | 0,88 | 0,77 | 0,84 | 0,84 | 0,82 | 0,83 | 0,87 | 0,88 | 0,88 | 0,80 | 0,79 | 0,69 | 0,74 | 0,44 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB22</b> | 0,92 | 0,93 | 0,87 | 0,91 | 0,80 | 0,87 | 0,88 | 0,79 | 0,84 | 0,88 | 0,85 | 0,81 | 0,87 | 0,90 | 0,88 | 0,82 | 0,81 | 0,78 | 0,79 | 0,55 | 0,39 | -    |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB23</b> | 0,88 | 0,92 | 0,89 | 0,92 | 0,77 | 0,87 | 0,85 | 0,84 | 0,84 | 0,86 | 0,85 | 0,87 | 0,87 | 0,92 | 0,90 | 0,89 | 0,84 | 0,84 | 0,82 | 0,77 | 0,67 | 0,57 | -    |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB24</b> | 0,86 | 0,90 | 0,91 | 0,88 | 0,89 | 0,89 | 0,89 | 0,87 | 0,90 | 0,94 | 0,95 | 0,92 | 0,89 | 0,91 | 0,94 | 0,92 | 0,90 | 0,92 | 0,89 | 0,85 | 0,80 | 0,71 | 0,47 | -    |      |      |      |      |      |    |
| <b>AB25</b> | 0,87 | 0,93 | 0,93 | 0,91 | 0,88 | 0,85 | 0,78 | 0,86 | 0,91 | 0,81 | 0,89 | 0,90 | 0,88 | 0,91 | 0,90 | 0,96 | 0,85 | 0,87 | 0,87 | 0,87 | 0,89 | 0,90 | 0,81 | 0,75 | -    |      |      |      |      |    |
| <b>AB26</b> | 0,85 | 0,95 | 0,95 | 0,90 | 0,91 | 0,85 | 0,74 | 0,83 | 0,89 | 0,85 | 0,84 | 0,90 | 0,86 | 0,85 | 0,84 | 0,85 | 0,83 | 0,86 | 0,90 | 0,91 | 0,85 | 0,87 | 0,80 | 0,78 | 0,62 | -    |      |      |      |    |
| <b>AB27</b> | 0,85 | 0,92 | 0,93 | 0,92 | 0,87 | 0,81 | 0,80 | 0,88 | 0,89 | 0,84 | 0,76 | 0,89 | 0,85 | 0,82 | 0,86 | 0,83 | 0,84 | 0,88 | 0,91 | 0,90 | 0,83 | 0,89 | 0,81 | 0,84 | 0,77 | 0,59 | -    |      |      |    |
| <b>AB28</b> | 0,91 | 0,92 | 0,94 | 0,88 | 0,87 | 0,84 | 0,81 | 0,87 | 0,88 | 0,84 | 0,83 | 0,87 | 0,85 | 0,84 | 0,85 | 0,82 | 0,84 | 0,88 | 0,91 | 0,87 | 0,82 | 0,86 | 0,84 | 0,84 | 0,81 | 0,70 | 0,45 | -    |      |    |
| <b>AB29</b> | 0,84 | 0,84 | 0,87 | 0,88 | 0,82 | 0,82 | 0,85 | 0,88 | 0,89 | 0,82 | 0,82 | 0,89 | 0,91 | 0,85 | 0,86 | 0,82 | 0,84 | 0,84 | 0,86 | 0,86 | 0,80 | 0,82 | 0,84 | 0,86 | 0,90 | 0,77 | 0,59 | 0,60 | -    |    |
| <b>AB30</b> | 0,83 | 0,87 | 0,83 | 0,83 | 0,81 | 0,83 | 0,87 | 0,77 | 0,82 | 0,79 | 0,81 | 0,86 | 0,98 | 0,88 | 0,85 | 0,83 | 0,84 | 0,84 | 0,87 | 0,87 | 0,83 | 0,88 | 0,76 | 0,82 | 0,83 | 0,81 | 0,66 | 0,67 | 0,59 | -  |

**Anexo 3**, Matriz de dissimilaridade de *locos* AFLP de acessos de Castanheira-do-Brasil originários de Manaus IFAM - AM

|             | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19   | 20   | 21   | 22   | 23   | 24   | 25   | 26   | 27   | 28   | 29   | 30 |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|
| <b>MI1</b>  | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI2</b>  | 0,56 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI3</b>  | 0,63 | 0,63 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI4</b>  | 0,77 | 0,86 | 0,85 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI5</b>  | 0,75 | 0,80 | 0,74 | 0,77 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI6</b>  | 0,75 | 0,81 | 0,76 | 0,78 | 0,75 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI7</b>  | 0,78 | 0,82 | 0,78 | 0,71 | 0,78 | 0,56 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI8</b>  | 0,79 | 0,85 | 0,76 | 0,77 | 0,78 | 0,70 | 0,61 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI9</b>  | 0,75 | 0,81 | 0,78 | 0,79 | 0,75 | 0,66 | 0,67 | 0,40 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI10</b> | 0,69 | 0,70 | 0,65 | 0,82 | 0,81 | 0,69 | 0,70 | 0,68 | 0,64 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI11</b> | 0,74 | 0,65 | 0,63 | 0,83 | 0,79 | 0,72 | 0,73 | 0,78 | 0,75 | 0,45 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI12</b> | 0,75 | 0,66 | 0,80 | 0,86 | 0,85 | 0,83 | 0,79 | 0,87 | 0,86 | 0,72 | 0,60 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI13</b> | 0,66 | 0,71 | 0,74 | 0,88 | 0,85 | 0,88 | 0,78 | 0,84 | 0,80 | 0,74 | 0,71 | 0,53 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI14</b> | 0,74 | 0,81 | 0,75 | 0,89 | 0,83 | 0,89 | 0,89 | 0,86 | 0,84 | 0,84 | 0,80 | 0,80 | 0,57 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI15</b> | 0,84 | 0,83 | 0,79 | 0,90 | 0,83 | 0,85 | 0,81 | 0,85 | 0,83 | 0,82 | 0,77 | 0,76 | 0,70 | 0,75 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI16</b> | 0,78 | 0,83 | 0,73 | 0,91 | 0,80 | 0,84 | 0,86 | 0,87 | 0,84 | 0,69 | 0,60 | 0,74 | 0,73 | 0,78 | 0,76 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI17</b> | 0,80 | 0,74 | 0,81 | 0,86 | 0,77 | 0,73 | 0,81 | 0,83 | 0,79 | 0,65 | 0,54 | 0,66 | 0,78 | 0,86 | 0,78 | 0,58 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI18</b> | 0,70 | 0,74 | 0,68 | 0,89 | 0,83 | 0,78 | 0,84 | 0,91 | 0,87 | 0,61 | 0,61 | 0,68 | 0,68 | 0,84 | 0,76 | 0,65 | 0,65 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI19</b> | 0,84 | 0,81 | 0,86 | 0,88 | 0,90 | 0,86 | 0,87 | 0,87 | 0,83 | 0,75 | 0,72 | 0,80 | 0,80 | 0,85 | 0,86 | 0,81 | 0,74 | 0,72 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI20</b> | 0,73 | 0,72 | 0,53 | 0,86 | 0,80 | 0,80 | 0,76 | 0,77 | 0,78 | 0,63 | 0,59 | 0,78 | 0,70 | 0,71 | 0,78 | 0,63 | 0,72 | 0,66 | 0,78 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI21</b> | 0,70 | 0,61 | 0,61 | 0,81 | 0,85 | 0,76 | 0,79 | 0,82 | 0,80 | 0,60 | 0,63 | 0,71 | 0,74 | 0,85 | 0,83 | 0,77 | 0,73 | 0,59 | 0,78 | 0,59 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI22</b> | 0,69 | 0,75 | 0,68 | 0,76 | 0,74 | 0,82 | 0,80 | 0,73 | 0,76 | 0,70 | 0,68 | 0,79 | 0,78 | 0,75 | 0,82 | 0,69 | 0,72 | 0,73 | 0,84 | 0,59 | 0,68 | -    |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI23</b> | 0,70 | 0,73 | 0,74 | 0,81 | 0,77 | 0,84 | 0,79 | 0,73 | 0,70 | 0,73 | 0,70 | 0,76 | 0,67 | 0,72 | 0,71 | 0,70 | 0,82 | 0,75 | 0,80 | 0,68 | 0,72 | 0,65 | -    |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI24</b> | 0,68 | 0,70 | 0,68 | 0,81 | 0,78 | 0,82 | 0,77 | 0,77 | 0,75 | 0,74 | 0,68 | 0,77 | 0,73 | 0,74 | 0,78 | 0,73 | 0,71 | 0,79 | 0,83 | 0,60 | 0,69 | 0,71 | 0,50 | -    |      |      |      |      |      |    |
| <b>MI25</b> | 0,68 | 0,71 | 0,69 | 0,84 | 0,79 | 0,80 | 0,80 | 0,77 | 0,78 | 0,75 | 0,71 | 0,81 | 0,72 | 0,67 | 0,83 | 0,74 | 0,79 | 0,80 | 0,86 | 0,65 | 0,73 | 0,67 | 0,62 | 0,49 | -    |      |      |      |      |    |
| <b>MI26</b> | 0,69 | 0,71 | 0,66 | 0,89 | 0,76 | 0,82 | 0,85 | 0,79 | 0,77 | 0,70 | 0,65 | 0,76 | 0,72 | 0,68 | 0,78 | 0,65 | 0,75 | 0,73 | 0,84 | 0,60 | 0,73 | 0,70 | 0,61 | 0,49 | 0,33 | -    |      |      |      |    |
| <b>MI27</b> | 0,70 | 0,71 | 0,64 | 0,86 | 0,80 | 0,80 | 0,80 | 0,77 | 0,75 | 0,67 | 0,59 | 0,71 | 0,66 | 0,70 | 0,79 | 0,65 | 0,71 | 0,72 | 0,82 | 0,63 | 0,72 | 0,71 | 0,60 | 0,55 | 0,50 | 0,37 | -    |      |      |    |
| <b>MI28</b> | 0,77 | 0,80 | 0,77 | 0,89 | 0,87 | 0,80 | 0,83 | 0,76 | 0,79 | 0,65 | 0,69 | 0,75 | 0,69 | 0,71 | 0,86 | 0,67 | 0,75 | 0,78 | 0,81 | 0,71 | 0,78 | 0,78 | 0,66 | 0,66 | 0,62 | 0,53 | 0,44 | -    |      |    |
| <b>MI29</b> | 0,76 | 0,75 | 0,65 | 0,85 | 0,82 | 0,83 | 0,82 | 0,77 | 0,79 | 0,68 | 0,69 | 0,80 | 0,73 | 0,71 | 0,81 | 0,74 | 0,83 | 0,75 | 0,85 | 0,58 | 0,76 | 0,66 | 0,66 | 0,63 | 0,54 | 0,50 | 0,52 | 0,61 | -    |    |
| <b>MI30</b> | 0,70 | 0,74 | 0,70 | 0,82 | 0,76 | 0,79 | 0,74 | 0,69 | 0,70 | 0,73 | 0,72 | 0,74 | 0,70 | 0,71 | 0,77 | 0,73 | 0,73 | 0,76 | 0,82 | 0,66 | 0,75 | 0,69 | 0,59 | 0,65 | 0,67 | 0,64 | 0,61 | 0,60 | 0,64 | -  |

**Anexo 4,** Matriz de dissimilaridade de *locos* AFLP de acessos de Castanheira-do-Brasil originários de Parintins - AM

|            | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19   | 20   | 21   | 22   | 23   | 24   | 25   | 26   | 27   | 28   | 29   | 30 |
|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|
| <b>P1</b>  | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P2</b>  | 0,72 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P3</b>  | 0,77 | 0,77 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P4</b>  | 0,72 | 0,73 | 0,73 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P5</b>  | 0,81 | 0,81 | 0,81 | 0,61 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P6</b>  | 0,77 | 0,65 | 0,71 | 0,62 | 0,77 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P7</b>  | 0,67 | 0,80 | 0,71 | 0,60 | 0,71 | 0,66 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P8</b>  | 0,85 | 0,63 | 0,83 | 0,74 | 0,82 | 0,60 | 0,76 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P9</b>  | 0,73 | 0,80 | 0,73 | 0,84 | 0,88 | 0,73 | 0,67 | 0,80 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P10</b> | 0,77 | 0,85 | 0,89 | 0,76 | 0,78 | 0,78 | 0,74 | 0,83 | 0,88 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P11</b> | 0,76 | 0,77 | 0,80 | 0,65 | 0,71 | 0,60 | 0,64 | 0,76 | 0,63 | 0,64 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P12</b> | 0,76 | 0,78 | 0,72 | 0,72 | 0,83 | 0,71 | 0,67 | 0,79 | 0,53 | 0,79 | 0,52 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P13</b> | 0,68 | 0,78 | 0,79 | 0,71 | 0,81 | 0,70 | 0,65 | 0,74 | 0,63 | 0,71 | 0,58 | 0,47 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P14</b> | 0,71 | 0,78 | 0,82 | 0,75 | 0,76 | 0,74 | 0,67 | 0,79 | 0,66 | 0,76 | 0,60 | 0,60 | 0,52 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P15</b> | 0,65 | 0,82 | 0,82 | 0,71 | 0,83 | 0,77 | 0,67 | 0,84 | 0,68 | 0,71 | 0,66 | 0,60 | 0,56 | 0,55 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P16</b> | 0,70 | 0,87 | 0,90 | 0,80 | 0,76 | 0,82 | 0,78 | 0,87 | 0,80 | 0,77 | 0,77 | 0,79 | 0,71 | 0,74 | 0,74 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P17</b> | 0,68 | 0,88 | 0,83 | 0,73 | 0,73 | 0,78 | 0,67 | 0,89 | 0,71 | 0,72 | 0,67 | 0,66 | 0,69 | 0,61 | 0,52 | 0,71 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P18</b> | 0,76 | 0,82 | 0,79 | 0,74 | 0,78 | 0,79 | 0,69 | 0,85 | 0,80 | 0,77 | 0,75 | 0,75 | 0,74 | 0,67 | 0,69 | 0,82 | 0,66 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P19</b> | 0,78 | 0,84 | 0,79 | 0,73 | 0,70 | 0,75 | 0,67 | 0,84 | 0,67 | 0,81 | 0,69 | 0,67 | 0,69 | 0,70 | 0,65 | 0,77 | 0,53 | 0,75 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P20</b> | 0,69 | 0,84 | 0,79 | 0,71 | 0,77 | 0,76 | 0,63 | 0,87 | 0,78 | 0,78 | 0,75 | 0,74 | 0,70 | 0,70 | 0,58 | 0,78 | 0,57 | 0,73 | 0,60 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P21</b> | 0,78 | 0,87 | 0,80 | 0,71 | 0,78 | 0,80 | 0,62 | 0,86 | 0,79 | 0,79 | 0,74 | 0,75 | 0,77 | 0,75 | 0,63 | 0,80 | 0,55 | 0,74 | 0,57 | 0,53 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P22</b> | 0,71 | 0,85 | 0,82 | 0,62 | 0,71 | 0,76 | 0,64 | 0,84 | 0,77 | 0,76 | 0,63 | 0,73 | 0,68 | 0,68 | 0,62 | 0,74 | 0,53 | 0,68 | 0,55 | 0,54 | 0,50 | -    |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P23</b> | 0,74 | 0,84 | 0,82 | 0,75 | 0,80 | 0,82 | 0,66 | 0,86 | 0,75 | 0,79 | 0,72 | 0,73 | 0,75 | 0,73 | 0,64 | 0,80 | 0,62 | 0,71 | 0,67 | 0,61 | 0,55 | 0,54 | -    |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>P24</b> | 0,78 | 0,85 | 0,87 | 0,75 | 0,75 | 0,80 | 0,67 | 0,88 | 0,74 | 0,75 | 0,74 | 0,76 | 0,73 | 0,75 | 0,65 | 0,77 | 0,64 | 0,70 | 0,61 | 0,60 | 0,60 | 0,63 | 0,47 | -    |      |      |      |      |      |    |
| <b>P25</b> | 0,82 | 0,88 | 0,86 | 0,85 | 0,90 | 0,81 | 0,74 | 0,90 | 0,80 | 0,79 | 0,81 | 0,73 | 0,78 | 0,80 | 0,71 | 0,80 | 0,66 | 0,74 | 0,71 | 0,66 | 0,69 | 0,72 | 0,66 | 0,65 | -    |      |      |      |      |    |
| <b>P26</b> | 0,74 | 0,80 | 0,80 | 0,72 | 0,75 | 0,69 | 0,61 | 0,81 | 0,70 | 0,70 | 0,63 | 0,67 | 0,65 | 0,62 | 0,60 | 0,71 | 0,52 | 0,66 | 0,56 | 0,60 | 0,58 | 0,50 | 0,59 | 0,59 | 0,56 | -    |      |      |      |    |
| <b>P27</b> | 0,71 | 0,84 | 0,85 | 0,74 | 0,79 | 0,79 | 0,61 | 0,88 | 0,82 | 0,68 | 0,75 | 0,81 | 0,73 | 0,76 | 0,73 | 0,76 | 0,63 | 0,76 | 0,66 | 0,65 | 0,70 | 0,65 | 0,66 | 0,66 | 0,70 | 0,48 | -    |      |      |    |
| <b>P28</b> | 0,73 | 0,86 | 0,81 | 0,77 | 0,75 | 0,78 | 0,71 | 0,81 | 0,85 | 0,75 | 0,80 | 0,77 | 0,69 | 0,75 | 0,77 | 0,82 | 0,80 | 0,76 | 0,83 | 0,77 | 0,81 | 0,74 | 0,73 | 0,78 | 0,82 | 0,71 | 0,71 | -    |      |    |
| <b>P29</b> | 0,73 | 0,85 | 0,81 | 0,74 | 0,72 | 0,76 | 0,68 | 0,89 | 0,84 | 0,75 | 0,77 | 0,79 | 0,79 | 0,78 | 0,74 | 0,82 | 0,73 | 0,77 | 0,72 | 0,69 | 0,71 | 0,70 | 0,72 | 0,74 | 0,80 | 0,71 | 0,76 | 0,60 | -    |    |
| <b>P30</b> | 0,78 | 0,84 | 0,83 | 0,81 | 0,67 | 0,79 | 0,75 | 0,86 | 0,89 | 0,92 | 0,75 | 0,79 | 0,73 | 0,68 | 0,78 | 0,77 | 0,73 | 0,76 | 0,73 | 0,77 | 0,73 | 0,69 | 0,75 | 0,72 | 0,74 | 0,63 | 0,77 | 0,69 | 0,68 | -  |

**Anexo 5**, Matriz de dissimilaridade de *locos* AFLP de acessos de Castanheira-do-Brasil originários de Manaus Aeroporto - AM,

|             | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19   | 20   | 21   | 22   | 23   | 24   | 25   | 26   | 27   | 28   | 29   | 30 |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|
| <b>MA1</b>  | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA2</b>  | 0,46 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA3</b>  | 0,74 | 0,69 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA4</b>  | 0,67 | 0,67 | 0,72 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA5</b>  | 0,71 | 0,67 | 0,51 | 0,70 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA6</b>  | 0,76 | 0,78 | 0,79 | 0,72 | 0,76 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA7</b>  | 0,80 | 0,81 | 0,78 | 0,74 | 0,76 | 0,41 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA8</b>  | 0,76 | 0,73 | 0,78 | 0,76 | 0,73 | 0,60 | 0,54 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA9</b>  | 0,72 | 0,84 | 0,85 | 0,75 | 0,85 | 0,71 | 0,76 | 0,75 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA10</b> | 0,82 | 0,89 | 0,88 | 0,78 | 0,86 | 0,79 | 0,76 | 0,76 | 0,63 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA11</b> | 0,71 | 0,84 | 0,87 | 0,77 | 0,85 | 0,68 | 0,71 | 0,71 | 0,50 | 0,69 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA12</b> | 0,78 | 0,88 | 0,90 | 0,78 | 0,87 | 0,70 | 0,68 | 0,72 | 0,52 | 0,43 | 0,54 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA13</b> | 0,70 | 0,74 | 0,81 | 0,77 | 0,79 | 0,80 | 0,80 | 0,76 | 0,65 | 0,75 | 0,70 | 0,71 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA14</b> | 0,76 | 0,77 | 0,74 | 0,70 | 0,78 | 0,78 | 0,74 | 0,76 | 0,72 | 0,69 | 0,74 | 0,65 | 0,74 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA15</b> | 0,75 | 0,74 | 0,77 | 0,75 | 0,77 | 0,77 | 0,72 | 0,67 | 0,78 | 0,79 | 0,78 | 0,76 | 0,78 | 0,63 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA16</b> | 0,69 | 0,58 | 0,69 | 0,66 | 0,62 | 0,76 | 0,79 | 0,78 | 0,84 | 0,83 | 0,85 | 0,84 | 0,78 | 0,65 | 0,61 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA17</b> | 0,67 | 0,57 | 0,72 | 0,70 | 0,68 | 0,78 | 0,80 | 0,76 | 0,78 | 0,79 | 0,80 | 0,79 | 0,72 | 0,63 | 0,64 | 0,40 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA18</b> | 0,72 | 0,78 | 0,87 | 0,70 | 0,86 | 0,75 | 0,80 | 0,80 | 0,72 | 0,66 | 0,75 | 0,67 | 0,67 | 0,66 | 0,73 | 0,71 | 0,68 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA19</b> | 0,75 | 0,64 | 0,79 | 0,79 | 0,76 | 0,83 | 0,82 | 0,80 | 0,86 | 0,81 | 0,90 | 0,80 | 0,72 | 0,73 | 0,74 | 0,56 | 0,58 | 0,70 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA20</b> | 0,69 | 0,62 | 0,72 | 0,73 | 0,68 | 0,80 | 0,79 | 0,75 | 0,85 | 0,82 | 0,86 | 0,81 | 0,80 | 0,68 | 0,70 | 0,55 | 0,59 | 0,73 | 0,47 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA21</b> | 0,68 | 0,60 | 0,72 | 0,65 | 0,69 | 0,81 | 0,82 | 0,73 | 0,80 | 0,83 | 0,80 | 0,79 | 0,82 | 0,73 | 0,67 | 0,59 | 0,55 | 0,77 | 0,71 | 0,57 | -    |      |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA22</b> | 0,76 | 0,81 | 0,81 | 0,84 | 0,85 | 0,73 | 0,78 | 0,76 | 0,79 | 0,87 | 0,81 | 0,85 | 0,83 | 0,80 | 0,78 | 0,80 | 0,75 | 0,80 | 0,85 | 0,80 | 0,74 | -    |      |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA23</b> | 0,74 | 0,84 | 0,85 | 0,71 | 0,81 | 0,75 | 0,77 | 0,79 | 0,71 | 0,69 | 0,70 | 0,71 | 0,80 | 0,74 | 0,72 | 0,82 | 0,78 | 0,63 | 0,80 | 0,72 | 0,76 | 0,76 | -    |      |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA24</b> | 0,72 | 0,89 | 0,87 | 0,78 | 0,85 | 0,65 | 0,65 | 0,73 | 0,68 | 0,66 | 0,65 | 0,67 | 0,78 | 0,78 | 0,73 | 0,83 | 0,81 | 0,68 | 0,86 | 0,81 | 0,80 | 0,75 | 0,56 | -    |      |      |      |      |      |    |
| <b>MA25</b> | 0,76 | 0,79 | 0,81 | 0,85 | 0,80 | 0,89 | 0,82 | 0,83 | 0,89 | 0,79 | 0,88 | 0,82 | 0,85 | 0,75 | 0,68 | 0,70 | 0,66 | 0,77 | 0,59 | 0,60 | 0,75 | 0,84 | 0,78 | 0,81 | -    |      |      |      |      |    |
| <b>MA26</b> | 0,80 | 0,80 | 0,88 | 0,82 | 0,88 | 0,84 | 0,78 | 0,83 | 0,78 | 0,64 | 0,81 | 0,65 | 0,82 | 0,67 | 0,70 | 0,76 | 0,68 | 0,68 | 0,70 | 0,72 | 0,83 | 0,84 | 0,72 | 0,71 | 0,65 | -    |      |      |      |    |
| <b>MA27</b> | 0,81 | 0,79 | 0,84 | 0,81 | 0,82 | 0,86 | 0,85 | 0,84 | 0,85 | 0,77 | 0,85 | 0,82 | 0,81 | 0,69 | 0,67 | 0,67 | 0,57 | 0,69 | 0,70 | 0,72 | 0,79 | 0,86 | 0,78 | 0,79 | 0,64 | 0,51 | -    |      |      |    |
| <b>MA28</b> | 0,78 | 0,81 | 0,83 | 0,80 | 0,86 | 0,72 | 0,69 | 0,73 | 0,78 | 0,80 | 0,71 | 0,81 | 0,81 | 0,78 | 0,72 | 0,78 | 0,73 | 0,77 | 0,84 | 0,82 | 0,76 | 0,67 | 0,75 | 0,62 | 0,78 | 0,75 | 0,72 | -    |      |    |
| <b>MA29</b> | 0,72 | 0,81 | 0,81 | 0,75 | 0,79 | 0,73 | 0,75 | 0,79 | 0,76 | 0,70 | 0,70 | 0,71 | 0,80 | 0,72 | 0,69 | 0,74 | 0,69 | 0,71 | 0,79 | 0,74 | 0,77 | 0,83 | 0,65 | 0,65 | 0,78 | 0,70 | 0,68 | 0,62 | -    |    |
| <b>MA30</b> | 0,84 | 0,86 | 0,88 | 0,85 | 0,85 | 0,78 | 0,78 | 0,81 | 0,82 | 0,76 | 0,79 | 0,79 | 0,84 | 0,76 | 0,76 | 0,79 | 0,74 | 0,76 | 0,81 | 0,78 | 0,76 | 0,78 | 0,77 | 0,72 | 0,77 | 0,64 | 0,61 | 0,60 | 0,63 | -  |

