

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



DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM
POPULAÇÕES DE BURITI (*Mauritia flexuosa* L. F.) COM
BASE NOS MARCADORES MOLECULARES AFLP.

LIENE ROCHA PICANÇO GOMES

Manaus
2009

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

LIENE ROCHA PICANÇO GOMES

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM
POPULAÇÕES DE BURITI (*Mauritia flexuosa* L. F.) COM
BASE NOS MARCADORES MOLECULARES AFLP.

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a.: Jânia Lilia da Silva Bentes

MANAUS

2009

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Gomes, Liene Rocha Picanço

G633d Diversidade e estrutura genética em populações de buriti
(*Mauritia flexuosa* L. F.) com base nos marcadores moleculares
AFLP / Liene Rocha Picanço Gomes. - Manaus: UFAM, 2009.
43 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais)
— Universidade Federal do Amazonas, 2009.
Orientadora: Prof^a. Dra. Jânia Lilia da Silva Bentes

1. *Mauritia flexuosa* 2. Marcadores moleculares. I. Bentes,
Jânia Lilia da Silva II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 582.545:631.523(043.3)

“Diversidade e estrutura genética em populações de buriti (*Mauritia flexuosa* L.
f.) com base nos marcadores moleculares AFLP”

LIENE ROCHA PICANÇO GOMES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jânia Lilia da Silva Bentes

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Florestais e Ambientais da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade
Federal do Amazonas como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em 05 de junho de 2009.

BANCA EXAMINADORA

A Prof^a. Dr^a. Jânia Lilia da Silva Bentes, Presidente
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

A Prof^a. Dr^a. Bianca Waléria Bertoni, Membro
Universidade de Riberão Preto – UNAERP/SP

Ao Prof. Dr. Fábio Medeiros Ferreira, Membro
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Aos meus avôs Deolinda e Antônio Francisco

Picanço (*In memoriam*)

Dedico

AGRADECIMENTOS

À DEUS.

A minha família que sempre esteve ao meu lado, me incentivando e me apoiando em todos os momentos.

A Prof^a. Dr^a. Jânia Lilia da Silva Bentes pela orientação, apoio e incentivo durante a realização deste trabalho

A Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Gomes Lopes pela amizade e incentivo de ingressar no Mestrado.

Ao amigo Pedro, pelo apoio, amizade, ensinamentos e principalmente pela paciência de ter nos ensinado a técnica de AFLP.

Ao Prof. Dr. José Ferreira pelo grande apoio, incentivo, amizade e força nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Fábio Medeiros Ferreira pela ajuda com o programa e as análise dos dados.

A Prof^a. Dr^a. Bianca Bertoni, por aceitar o convite para fazer parte da banca de defesa.

A Prof^a. Dr^a. Doriane Picanço Rodrigues pelo auxílio na análise e interpretação dos dados.

Ao Prof. Dr. Luis Contim por disponibilizar a estrutura do laboratório de Biotecnologia da Uninilton Lins para realização de uma das etapas do trabalho.

Ao Prof. Dr. José Odair por disponibilizar a estrutura do Laboratório do BIOATIVOS para realização de uma das etapas do trabalho e auxílios prestados sempre que necessário.

A Raquel e Vanessa que juntas fizeram parte dessa caminhada, das angústias, das dificuldades e pelas boas risadas que demos juntas.

À Universidade Federal do Amazonas e ao Departamento de Ciências Agrárias, incluindo os Professores e funcionários, pela oportunidade de realização e por todos os conhecimentos transmitidos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, pela concessão da bolsa de estudo durante o curso e o auxílio financeiro a pesquisa.

Ao PIATAM, pelo apoio logístico nas coletas do material biológico e recursos financeiros.

As minhas amigas Eliene, Iza, Ramilla, Rafaela e Suzy pela amizade, carinho, companheirismo e momentos felizes que passamos juntas.

A Laura pelo apoio nas coletas do material biológico e pela sua amizade.

Ao Santiago pelo apoio e ajuda na elaboração do pré-projeto.

A todos os que, de uma forma ou de outra colaboraram para a realização deste trabalho.

AGRADEÇO

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (A e B) <i>Mauritia Flexuosa</i> ; (C) Inflorescência de <i>M. flexuosa</i> ; (D) Cacho <i>M. flexuosa</i> ; (E e F) Frutos de <i>M. flexuosa</i> .	5
Figura 2: Distribuição geográfica de <i>Mauritia flexuosa</i> .	6
Figura 3: (A) Flor feminina de <i>Mauritia Flexuosa</i> ; (B) Flor masculina de <i>M. flexuosa</i> .	7
Figura 4: Mapa com locais de ocorrência de <i>Mauritia flexuosa</i> no trecho do Gasoduto Coari-Manaus.	18
Figura 5: Visualização de quantificação das amostras de DNA de 7 indivíduos de <i>Mauritia flexuosa</i> em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.	27
Figura 6: Gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata a 6% para as 13 combinações de <i>primers</i> .	29
Figura 7: Gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata a 6% para a combinação E-ACA/M-CGC	30
Figura 8: Dendrograma de UPGMA das populações de <i>Mauritia flexuosa</i> , calculado de acordo com a identidade genética de Nei (1978). Os números descritos nos ramos foram obtidos para o teste de bootstrap após 1.000 reamostragens.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Locais de coleta, coordenadas geográficas (latitude e longitude).	17
Tabela 2: Combinações de <i>primers</i> usados na amplificação seletiva.	23
Tabela 3: Lista de combinação de primer, número de bandas detectadas e porcentagem de locos polimórficos para cada população de <i>Mauritia Flexuosa</i> .	31
Tabela 4: Matriz de distância genética e geográfica entre as 4 populações de <i>Mauritia Flexuosa</i> . Abaixo da diagonal principal estão as distâncias genéticas e acima as distâncias geográficas em Km. As siglas BJ, LS, ESP e BU correspondem, respectivamente a Bom Jesus, Lauro Sodré, Esperança II e Santa Luzia do Buíçuzinho.	31
Tabela 5: Estimativa de fluxo gênico entre as 4 populações de <i>Mauritia flexuosa</i> . As siglas BJ, LS, ESP e BU correspondem, respectivamente a Bom Jesus, Lauro Sodré, Esperança II e Santa Luzia do Buíçuzinho.	31
Tabela 6: Resultado da análise de variância molecular (AMOVA).	33

RESUMO

O buriti (*Mauriti flexuosa* L. f.) é uma palmeira da família Arecaceae com ampla distribuição geográfica por toda a região Amazônica e restrita a América do Sul. Apresenta importância econômica, tendo praticamente todas as suas partes aproveitadas. Seu uso vai desde a alimentação até o uso medicinal. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade genética de populações naturais de buriti por meio de marcadores moleculares AFLP. Foram analisadas quatro populações localizadas ao longo do Gasoduto Coari-Manaus. Para esta análise foram usadas quatro combinações de *primers* (E-AAC/M-CAC, E-AAC/M-CGC, E-ACA/M-CGC e E-ATC/M-CCA). Os *primers* revelaram 339 locos com polimorfismo variando de 81,1% a 91,1% entre as populações. O *Fst* calculado foi de 0,23, e o resultado da Análise Molecular de Variância (AMOVA) atribuiu 77,18% da variação dentro das populações. O dendrograma construído com base nos marcadores AFLP revelou a formação de dois grupos, mostrando que as populações de Bom Jesus e Lauro Sodré são as mais semelhantes geneticamente. Os resultados obtidos mostraram que as distâncias genéticas não estão correlacionadas com a distância geográfica.

Palavras-chave: Variabilidade genética, marcador molecular, palmeira, AFLP.

ABSTRACT

Buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) is a palm from the Arecaceae family with a large geographic distribution all around the Amazon region and restrict to South America. It represents economic importance, having almost every part used. It is used as food and medicaments. The aim of this work was to characterize the genetic diversity of buriti's natural population through molecular mark AFLP. It were analyzed four population located beyond Gasoduto Coari-Manaus. For its analysis four combinations of primers were used (E-AAC/M-CAC, E-AAC/M-CGC, E-ACA/m-CGC e E-ATC/M-CCA). The primers reveled 339 focus with polymorphism, going from 81,1% to 91,1% among the population. The *Fst* calculated was 0.23 and the Variety Molecular Analysis's result (AMOVA) was 77,18% of varieties in populations. The reveled dendrogram base on AFLP mark showed the formation of two groups, resulting that Bom Jesus and Lauro Sodré population are the most genetically alike. The result gained showed that the genetic distance are not related to the geographic distance.

Key-Words: Genetic variability, molecular marker, palm, AFLP.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Classificação Taxonômica	4
3.2 Descrição da espécie	4
3.3 Distribuição geográfica	6
3.4 Ecologia da espécie	7
3.5 Utilização de <i>M. Flexuosa</i>	8
3.6 Estudo da Variabilidade genética	9
3.7 Fluxo Gênico	11
3.8 Marcadores Moleculares	13
3.8.1 AFLP (<i>Amplified Fragment Length Polymorfism</i>)	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Coleta de material vegetal	17
4.2 Extração de DNA	18
4.3 Quantificação do DNA	19
4.4 Análise dos marcadores AFLP	20
4.4.1 Digestão do DNA genômico	20
4.4.2 Ligação dos adaptadores	20
4.4.3 Ligação dos adaptadores aos fragmentos de restrição	21
4.4.4 Pré-Amplificação	22

4.4.5 Amplificação seletiva	22
4.4.6 Eletroforese em gel de Poliacrilamida	23
4.4.7 Revelação dos géis	25
4.5 Análise estatística dos dados	27
5. RESULTADOS	28
5.1 Extração de DNA	28
5.2 Seleção de <i>primers</i>	28
5.3 Níveis de polimorfismo detectados pelo marcador AFLP	29
5.4 Análise do dendrograma	31
5.5 Diversidade genética entre e dentro das populações	33
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÕES	39
8. REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

A grande preocupação com as possíveis alterações de clima a nível mundial vem gerando enormes pressões internacionais contra a ocupação da Floresta Amazônica, sobretudo contra a exploração madeireira e desmatamentos. Poucas são as opções sustentáveis para o desenvolvimento da Amazônia, destacam-se as palmeiras como alternativas de grande potencial para o desenvolvimento sustentável da região com benefícios sociais, econômicos e ambientais. As palmeiras nativas da Amazônia, embora com grande potencial para o desenvolvimento da região, a maior parte encontra-se em condição selvagem ou semi-selvagem e não existem planos de manejo para a exploração florestal e para a conservação.

O buriti é uma espécie com grande potencial e ainda não domesticada, se desenvolve muito bem em condições de solos pobres, ácidos e alagados, que não se prestam para a agricultura. Essas características de comportamento talvez impeçam as populações naturais ameaçadas de antropismos indesejáveis, de não colonizar áreas agricultáveis.

Essa palmeira tem importância ornamental e estratégica na preservação da fauna, uma vez que seus frutos são fonte de alimentos para várias aves e mamíferos, têm grande utilização na culinária regional, no preparo de doces e geléias e na extração do óleo, rico em vitamina A, além de ser indicadora natural de áreas com recursos hídricos (ALMEIDA e SILVA, 1994).

A conservação de populações de espécies nativas depende de uma política adequada de proteção ambiental, resgate e conservação dos recursos genéticos, e também do desenvolvimento de métodos adequados para a

propagação das diferentes espécies de interesse, visando sua conservação *in situ*, e reflorestamento de áreas degradadas (RIBEIRO e SILVA, 1996), principalmente aquelas áreas inundáveis as quais as espécies têm facilidade de adaptação.

O conhecimento da distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações de buriti subsidiará futuras ações de conservação dos recursos genéticos da espécie.

Muitas são as técnicas para estudo de diversidade genética envolvendo marcadores moleculares, entre elas destaca-se a técnica AFLP (*Amplified Fragment Length Polimorfism*), pois esta detecta um maior número de locos, comparativamente às demais técnicas que revelam marcadores moleculares, possibilita ampla cobertura do genoma e apresenta um baixo custo por informação (loco) (LOPES et al., 2002).

Neste estudo foi utilizada a técnica de AFLP para analisar a variabilidade genética entre e dentro de populações naturais de buriti, visando fornecer informações que servirão de subsídio para planos de manejo e conservação desta espécie.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a diversidade e estrutura genética de populações de buriti por meio de marcadores moleculares AFLP.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar e testar combinações de *primers* de AFLP.
- Caracterizar a variabilidade existente entre e dentro de populações naturais de buriti na área do gasoduto Coari-Manaus.
- Analisar a estrutura genética de populações de buriti na área de influência do Gasoduto Coari-Manaus.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Classificação Taxonômica

O buritizeiro pertence ao reino Plantae, superdivisão Spermatophyta, divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, subclasse Arecidae, ordem Arecales, família Arecaceae, sub-família Calamoideae, gênero *Mauritia* e espécie: *Mauritia flexuosa* Linnaeus filius (1782) (HENDERSON, 1995).

3.2 Descrição da espécie

Na língua indígena Buriti significa “árvore da vida” ou “árvore que emite líquidos”. No Brasil é popularmente chamada de buriti, miriti, muriti e buriti do brejo; nas Guianas, awuara, boche e palmeira boche; na Venezuela, moriche; na Colômbia, carangucha ou canangucha, moriche e nain; no Peru, aguaje e iñéjhe; na Bolívia, kikyura e palmeira real (HERDERSON, 1995).

M. flexuosa é uma palmeira ereta e de grande porte, podendo atingir cerca de 35 metros de altura, com estipe cilíndrico, levemente anelado, sem espinhos e diâmetro de aproximadamente 50 centímetros. As folhas estão reunidas, em número de 5 a 30, no ápice do estipe. São compostas por folíolos radiados, em forma de leque. Cada folha tem em torno de 120 a 136 pêndulos, são persistentes, pois mesmo quando mortas, permanecem na palmeira por vários meses. As inflorescências são cachos pêndulos (tipo espádice) que contém muitas flores, masculinas e femininas. Os frutos são carnosos (tipo drupa), indeiscentes, com cerca de 5 a 7 cm de comprimento e diâmetro de 4 a

5 cm, globosos, cobertos por duras escamas castanho-avermelhadas. A polpa é oleosa, de cor amarelo-ouro e envolve uma única semente oval ou globosa (Figura 1) (PRANCE, 1975; HERDENSON, 1995; DE PAULA FERNANDES 2001; STORTI, 1993).



Figura 1: (A e B) *Mauritia Flexuosa*; (C) Inflorescência de *M. flexuosa*; (D) Cacho *M. flexuosa*; (E e F) Frutos de *M. flexuosa*.

3.4 Ecologia da espécie

M. flexuosa é uma espécie dióica, ou seja, os buritizais apresentam espécimes com flores masculinas e outras com flores femininas (Figura 3). As inflorescências são do tipo interfoliar e ligeiramente semelhantes, com 2 a 3 m de comprimento. Na inflorescência masculina o período de formação até a produção de flores é de 2 a 3 meses, sendo a floração anual e cada indivíduo produz entre 4 a 7 inflorescência por ano. Nas plantas femininas esse período de formação até a produção de flores da inflorescência é de aproximadamente 2 meses, a floração ocorre principalmente nos meses de abril a junho e cada planta produz entre 4 a 7 inflorescências por ano. Os indivíduos masculinos apresentam floração anual e os femininos bianuais. A produção de frutos é longa e tem duração média de nove meses, sendo que, cada indivíduo produz frutos a cada dois anos (STORTI, 1993; DE PAULA FERNANDES, 2001).

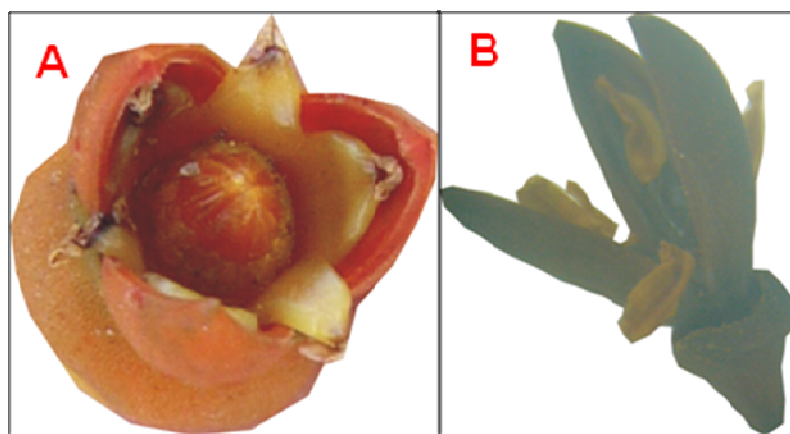


Figura 3: (A) Flor feminina de *Mauritia Flexuosa*; (B) Flor masculina de *M. flexuosa*.

Esta espécie apresenta mais de uma estratégia de dispersão, sendo elas: hidrocórica, zoocórica e barocórica. As sementes maduras são

constituídas de endosperma duro; embrião com duas regiões distintas, a proximal, na tonalidade amarela, e a distal de coloração branco-leitoso; e por dois sistemas distintos de proteção, o tegumento interno e externo. As sementes de buriti maturam antes do fruto (DE PAULA FERNANDES, 2001).

Os indivíduos dessa espécie, em condições naturais, começam a produzir frutos quando atingem seis metros acima do solo ou entre sete e dez anos de idade.

Hiraoka (1999) considerou o buriti uma espécie de sucessão inicial (pioneira), cuja germinação provavelmente acontece sob exatas condições de luz e umidade.

Uma grande variedade de insetos visita as inflorescências de buriti durante o seu período de florescimento, atraídos por uma abundante produção de pólen, néctar e outras partes da inflorescência. Sendo que os insetos da ordem Coleoptera são os mais freqüentes tanto nas inflorescências masculinas quanto nas femininas (STORTI, 1993).

3.5 Utilização de *M. flexuosa*

É utilizada por comunidades indígenas e extrativistas representando grande potencial econômico. No entanto, esta espécie ainda continua pouco explorada com relação a estudos que viabilizem o manejo de suas populações (DE PAULA FERNANDES, 2001).

É uma palmeira de uso bem variado, praticamente todas as partes do buriti são aproveitadas, desde a alimentação até o uso medicinal (MIRANDA et al., 2001).

A polpa dos frutos é usada na produção de doce, cremes, bombons, paçocas, sorvetes, licores e vitaminas de vários sabores e alta concentração de vitamina C. O óleo avermelhado extraído da polpa é usado como tempero culinário. As sementes, depois de torradas e moídas são utilizadas em substituição ao pó de café (ALMEIDA e SILVA, 1994; CAVALCANTE, 1991).

A palha das folhas maduras é usada na cobertura de casas rústicas e a embira retirada das folhas jovens, chamada de "seda" é usada para fazer redes, cestos, chapéus e esteiras. O pecíolo leve e poroso é utilizado na confecção de gaiolas, alçapões, brinquedos, móveis, balsas e remos (DE PAULA FERNANDES, 2001).

A raiz, curtida em vinho é usada na medicina popular contra reumatismo e o óleo da polpa como energético, vermífugo e contra queimaduras de pele (CAVALCANTE, 1991). A beleza de suas folhas em leque e o porte arbóreo faz com que tenha um potencial excelente para uso paisagístico (HENDERSON, 1995; DE PAULA FERNANDES, 2001).

3.6 Estudo da Variabilidade Genética

Nas últimas décadas vêm se intensificando os estudos genéticos em populações de espécies arbóreas de florestas tropicais, com amostragens adequadas tanto de populações como dentro das mesmas, além do uso de tecnologias genéticas adequadas para quantificar essa diversidade (KAGEYAMA et al., 2003). A distribuição da variabilidade genética natural é influenciada por fatores como modo de reprodução das espécies, sistema de

cruzamento, tamanho efetivo da população, distribuição geográfica e fluxo gênico (PAIVA, 1998).

Na área de genética de conservação, estudos vêm demonstrando que a redução das populações naturais tem levado a uma perda de genes adaptados a ambientes específicos de ocorrência das espécies arbóreas. A redução contínua no tamanho das populações as submete a perdas de variabilidade genética, por deriva genética (SEBBENN e ETTORI, 2001). A deriva pode causar a depressão por endogamia e conseqüentemente, reduzir a capacidade adaptativa, fertilidade, vigor, porte e produtividade. (RITLAND, 1996).

Estudos da variabilidade genética em populações naturais de plantas em regiões tropicais demonstram que estas preservam grandes quantidades de variabilidade dentro das populações, comparando-se com as existentes em outros ambientes, e a distribuição da variabilidade genética natural é influenciada por fatores como modo de reprodução das espécies, sistema de cruzamento, tamanho efetivo da população, distribuição geográfica e fluxo gênico (PAIVA, 1998; FREITAS et al., 2005).

Conhecer o padrão da variabilidade genética entre e dentro das populações é um valioso instrumento que poderá ajudar na adoção de práticas mais eficientes, no tocante à conservação, podendo servir de bases para técnica de manejo adequado de fragmentos e fornecer subsídios para medidas de conservação *in situ* (PEAKKAL et al., 2003).

Variabilidade genética é a base da biodiversidade e pode ser acessada por meio de marcadores genéticos. A utilização de marcadores genéticos em estudos populacionais de espécies arbóreas tem demonstrado tratar-se de ferramenta altamente potencial (FREITAS et al., 2005).

3.7 Fluxo Gênico

De acordo com Slatkin (1981) fluxo gênico é um termo coletivo que inclui todos os mecanismos que resultam no movimento de alelos de uma população para a outra. Ele está relacionado aos mecanismos de dispersão de pólen e sementes, os quais determinam o agrupamento genético espacial de populações (Botinno, 2006).

Há diversos fatores que influenciam e condicionam o fluxo de genes dentro de populações de plantas. O reconhecimento desses fatores e entendimento de seu papel são essências para se compreender como o fluxo gênico afeta a estrutura da população e sua adaptação a condições específicas de habitat (Souza, 2006).

A dispersão de pólen e sementes promove o fluxo gênico nas plantas, que é um importante componente da estrutura genética das espécies, pois reduz a divergência genética entre as populações (NASON e HAMRICK, 1997). Segundo Wrigth (1943), populações separadas por longas distâncias e com limitado fluxo gênico podem tornar-se diferenciadas geneticamente uma das outras pelo processo de isolamento de distâncias.

Hamrick e Loveless (1989), afirmam que populações de espécies cuja polinização é mediada por animais que percorrem longas distâncias, apresentam maior diversidade genética que aquelas polinizadas pelo vento ou animais que percorrem curtas distâncias, onde o fluxo gênico é limitado. Já a dispersão das sementes pelo vento ou por animais apresenta maior diversidade genética dentro das populações que a dispersão por barocoria.

Estrada e Fleming (1986) apontam para a alta taxa de dispersão zoocórica de ambientes tipicamente tropicais.

Gaiotto et. al. (2003) utilizaram marcadores microssatélites para se estimar a estrutura populacional, sistema de acasalamento e realizar teste de paternidade na espécie *Euterpe edulis* da família Arecaceae. A polinização é realizada por abelhas e pelo vento. Foi observada uma alta taxa de fluxo gênico entre indivíduos distantes até 22 Km, sendo por isso, considerado o maior evento de dispersão de fluxo gênico até então evidenciado para uma espécie tropical.

A dispersão de sementes pela água também pode assumir uma grande importância para a distribuição dos indivíduos da população. Geralmente, espécies de locais alagados apresentam características espécies de adaptação que permitem a sua sobrevivência, e uma delas, é a sua capacidade de sementes flutuarem (BARRAT-SEGRETAIN, 1996). Cada espécie apresenta um padrão de flutuação das sementes, e isso influencia na deposição e capacidade de colonizar novos ambientes (MARQUES e JOLY, 2000).

A nível populacional, apesar da influência de fatores locais. Tais como variação espacial da distribuição das espécies e a seleção de variação de microhabitats, a estruturação genética espacial é consequência de uma limitada dispersão de pólen e sementes (DEGEN et. al, 2001a; VEKEMANS e HARDY, 2004; CAVERS et. al., 2005).

3.8 Marcadores Moleculares

Marcadores moleculares são sequências de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente, eles têm sido empregados extensivamente e com sucesso na análise genética da plantas e na caracterização existente entre os indivíduos.

Até meados da década de 60, os marcadores moleculares utilizados em estudo de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, normalmente fenótipos identificados visualmente, como nanismo, cor da pétala, deficiência de clorofila ou morfologia foliar. Devido a isso, a disponibilidade desses marcadores era restrita a algumas espécies de plantas como: milho, tomate e ervilha. O marcador molecular pode ser definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou determinado segmento específico de DNA que corresponde a uma região do genoma que pode ser expresso ou não. Adiciona-se a isso que a sequência de um marcador molecular pode ser conhecida ou não (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

A revolução dos marcadores moleculares teve seu início com o surgimento dos marcadores bioquímicos, conhecidos como isoenzimas. O número de marcadores genéticos disponíveis foi aumentando bem como sua aplicabilidade que passou a incluir todas as espécies de plantas e animais. Com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismos da molécula de DNA. Os marcadores moleculares de DNA: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SSR (*Simple*

Sequence Repeats), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorfism*), entre outros permitiram uma maior cobertura genômica, quando comparados com as isoenzimas.

Os marcadores moleculares podem ser separados em dois grupos, os **codominantes** (RFLP, SSR e isoenzimas) e os **dominantes** (RAPD e AFLP). No caso dos dominantes, os alelos de um mesmo loco são revelados pela presença ou ausência de uma banda que, por sua vez, resulta da amplificação de um fragmento de determinado tamanho que é visualizado no gel. No entanto, não é possível saber se o loco amplificado está em homozigose ou heterozigose. Sendo assim, marcadores dominantes, ao contrário dos codominantes, não permitem a distinção entre genótipos homozigóticos e heterozigóticos os quais constituem apenas uma classe, isto é, a que apresenta o alelo amplificado. Os indivíduos nos quais o alelo não é amplificado constituem a outra classe, considerada homozigótica para ausência da banda, qualquer que seja o motivo pelo qual o fragmento não foi amplificado (LOPES et al., 2002).

3.8.1 AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorfism*)

A técnica do AFLP, descrita por Vos et al. (1995), associa os polimorfismos gerados por enzimas de restrição com a capacidade de detecção da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A análise de AFLP consiste essencialmente de quatro etapas. Na primeira etapa o DNA genômico total do indivíduo é clivado com duas enzimas de restrição (uma de corte raro combinada com outra de corte frequente). Na segunda etapa, adaptadores

específicos são ligados aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem. Na terceira etapa, uma fração dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente via PCR utilizando primers especificamente desenhados para reconhecer sequências nos adaptadores. Na quarta e última etapa, a subpopulação de fragmentos amplificados é separada em gel de alta resolução (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Esse marcador se caracteriza por ser altamente polimórfico, permitindo a diferenciação dos indivíduos de uma mesma espécie. Este ainda apresenta uma alta taxa de resolução, sendo altamente reprodutivo com a vantagem de não requerer nenhum tipo de conhecimento prévio sobre o genoma da espécie analisada (LOPES et al., 2002).

Cardoso et al. (2000) realizaram estudos sobre a diferenciação de *Euterpe edulis* pela análise de AFLP com 5 pares de *primers*, onde obtiveram um total de 429 fragmentos, sendo que 395 foram altamente polimórficos. Os resultados demonstraram que existe uma moderada variação genética dentro das populações (57, 4%) e entre as populações (42,6%). A diferenciação genética entre as populações foi positivamente relacionada com a distância geográfica ($F_{ST} = 0,426$)

Marcadores AFLPs foram utilizados por Clement et al. (2002) para avaliar a hipótese da existência de três raças (Pará, Solimões e Putumayo) de pupunha (*Bactris gasipaes*). Pela análise com seis primers, obtiveram 245 marcadores. O dendrograma construído pelo método UPGMA revelou dois grandes grupos: o primeiro grupo confirmou a raça Pará, mas o segundo sugeriu que a raça Solimões não existe; em lugar desta raça, a raça Putumayo se estende ao longo do rio Solimões até a Amazônia Central.

Souza (2006) estudou a diversidade genética de Araucária, onde verificou pela análise de AFLP que parte da variação genética encontra-se dentro de cada população, que apesar da espécie ter sofrido intensa exploração humana, mesmo assim ela ainda mantém sua diversidade genética.

Em espécies arbóreas, Freitas et al. (2005) utilizaram o marcador genético AFLP para estimar a variabilidade genética de uma população de *Myracrodruon urundeuva*, encontrando grande número de bandas polimórficas (total de 137) e identificando três grupos entre as progênies avaliadas, o que, segundo os autores ilustraria a alta variabilidade genética dentro das progênies.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta de material vegetal

Foram estudadas quatro populações espontâneas de buriti de diferentes comunidades do Estado do Amazonas localizadas no trecho do gasoduto Coari-Manaus: Bom Jesus, pertencente ao município de Anamã; Lauro Sodré, pertencente ao município de Codajás; Esperança II e Santa Luzia do Buiçuzinho, pertencentes ao município de Coari (Tabela 1) (Figura 4). A coleta foi realizada no período compreendido entre 13 a 23 de março de 2007.

Comunidades	Coordenadas	
	Latitude	Longitude
Bom Jesus (Anamã)	61° 17' 49" W	3° 36' 36" S
Lauro Sodré (Codajás)	62° 35' 29" W	3° 51' 28" S
Esperança II (Coari)	63° 00' 59" W	3° 59' 58" S
S ^{ta} Luzia do Buiçuzinho (Coari)	63° 25' 22" W	4° 00' 58" S

Tabela 1: Locais de coleta e coordenadas geográficas (latitude e longitude).

Para o estudo da diversidade genética entre e dentro das populações foram analisados 30 indivíduos de cada uma das populações. Amostras das folhas jovens e sem manchas foram coletadas e acondicionadas em sacos plásticos com sílica gel e levadas para o laboratório, onde foram submetidas à extração do DNA e análise com marcadores AFLP.

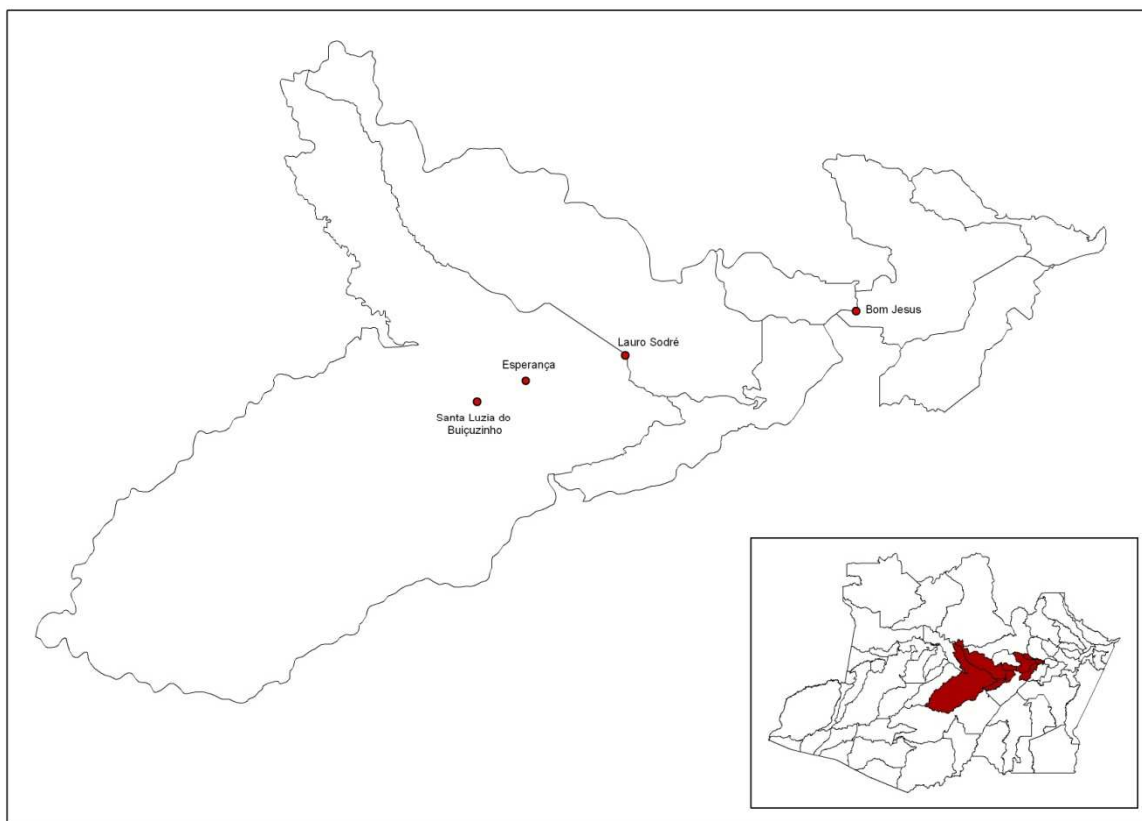


Figura 2: Mapa com locais de ocorrência de *Mauritia flexuosa* no trecho do Gasoduto Coari-Manaus.

4.2 Extração do DNA

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de folhas secas. Foi usado o método CTAB 2% (*Cationic Hexadecyltrimethyl Ammonium Bromide*), descrito por Murray e Thompson (1980), com modificações.

De cada planta foram pesados aproximadamente 0,6 gramas do tecido foliar e macerados em cadinhos de porcelana com auxílio de um bastão. O macerado foi transferido para microtubos de 1,5 mL contendo 700 µL de tampão CTAB 2%, 2 µL de β-mercaptoetanol e 35 µL de proteinase K previamente aquecidos a 65°C em banho-maria por 15 minutos. O macerado foi homogeneizado com o tampão e mantido por 40 minutos em banho-maria a

65°C. Durante este período, a cada 10 minutos foi feita uma homogeneização por inversão dos tubos.

Em seguida, foram acrescentados, a cada amostra, 600 µL de clorofórmio-álcool-isoamilico (24:1) e feita uma homogeneização por suaves inversões dos tubos durante 5 minutos. O material foi então submetido à centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma micropipeta e colocado em novos microtubos, nos quais foram adicionados 400 µL de isopropanol frio (-20 °C). Em seguida, as amostras foram incubadas no refrigerador (-20 °C) por 60 minutos para favorecer a precipitação do DNA e, posteriormente, centrifugados a 7.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa (isopropanol) foi descartada e o precipitado foi submetido a duas lavagens com 1 mL de etanol a 70% por 10 minutos e a uma lavagem com 1 mL de etanol absoluto por 3 minutos. Após as três lavagens com etanol, o precipitado ficou exposto a temperatura ambiente por 30 minutos para que este secasse. O DNA foi re-suspendido em 50 µL de água ultrapura e estocado a -20 °C.

4.3 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA genômico foi realizada em gel de agarose 0,8 % (p/v) por comparações visuais de sua fluorescência com aquelas de padrões de massa molecular conhecida de DNA do fago lambda. Para coloração os géis permaneceram imersos em brometo de etídeo (10 mg/mL) durante 15 minutos e posteriormente foram fotografados sob luz UV usando equipamento de fotodocumentação (Geldoc - Bio Rad). Depois de quantificados, todas as

amostras de DNA foram diluídas em água ultrapura para a concentração de 10 ng/ μ L.

4.4 Análise dos marcadores AFLP

O protocolo usado foi obtido a partir de uma compilação de protocolos disponíveis na literatura, sendo estes derivados dos procedimentos propostos originalmente por Vos et al. (1995).

4.4.1 Digestão de DNA genômico

Na digestão com a combinação das enzimas de restrição *EcoRI/MseI*, foram utilizados 10 ng de DNA genômico, 5,0 μ L do tampão “One Phor All” 10X (OPA; Amersham), 0,5 μ L de solução BSA 100X (Albumina de Soro Bovino) (10 μ g/ μ L), 0,5 μ L da enzima *MseI* (5 unidades/ μ L; New England Biolabs) e 0,4 μ L da enzima *EcoRI* (5 unidades/ μ L; Promega) em volume final de 50 μ L. As reações foram realizadas a 37°C por 3 horas. Após a restrição, as enzimas foram inativadas a 70°C por 15 minutos.

4.4.2 Ligação de Adaptadores

Os adaptadores sintetizados foram recebidos na forma de fita simples e para serem ligados às extremidades coesivas dos fragmentos gerados por restrição foi necessária a sua preparação em fita dupla. Os adaptadores foram preparados em quantidade suficiente para ligação de 120 amostras.

Para o preparo do adaptador *EcoRI* foram utilizados: 5,6 μL (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *EcoRI* oligo1 (seqüência 5' CTCGTAGACTGCGTACC 3'), 4,8 μL (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *EcoRI* oligo2 (seqüência 5' AATTGGTACGCAGTCTAC 3'), 6,0 μL do tampão "One Phor All" 10X (OPA; Amersham), 103,6 μL de água ultrapura. No preparo do adaptador *MseI* foram utilizados: 64,0 μL (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *MseI* oligo1 (seqüência 5' GACGATGAGTCCTGAG 3'), 56,0 μL (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *MseI* oligo2 (seqüência 5' TACTCAGGACTCAT 3'), 7,0 μL do tampão "One Phor All" 10X (OPA; Amersham) e 13,0 μL de água ultrapura. A reação de união das fitas foi realizada em termociclador a partir de um programa composto de 10 minutos a 65°C, 10 minutos a 37°C e 10 minutos a 25°C. Os adaptadores preparados foram armazenados a -20°C.

4.4.3 Ligação dos adaptadores aos fragmentos de restrição

Nas reações de ligação foram utilizados 1,0 μL do tampão 10X Buffer da Ligase (New England Biolabs), 1,0 μL do adaptador da enzima de corte raro (*EcoRI*), 1,0 μL do adaptador da enzima de corte freqüente (*MseI*), 0,33 μL da enzima T4 DNA Ligase (3 unidade/ μL ; New England Biolabs), 6,7 μL de água ultrapura e 50 μL da reação de digestão. As reações foram realizadas a 23°C por 3 horas, e as amostras armazenadas a -20°C.

4.4.4 Pré-Amplificação

Nas reações de pré-amplificação foram usados iniciadores complementares as seqüências dos sítios das enzimas de restrição com um nucleotídeo seletivo, foi usada a combinação de iniciadores EcoRI+A/Mse I+C. No preparo das reações foram utilizados 2,5 µL da amostra de DNA (digerido/ligado), 0,5 µL do iniciador da enzima de corte raro (EcoRI+A) (5' GACTGCGTACCAATTCA 3') (25 ng/µL), 0,5 µL do iniciador da enzima de corte freqüente (Mse I+C) (5' GATGAG TCC TGA GTA AC 3') (25 ng/µL), 0,4 µL de dNTP 2,5mM (Biosciense), 2,0 µL do tampão 10X Buffer B (Promega), 1,2 µL MgCl₂ 25mM (Promega), 0,3µL de Taq DNA polimerase (5,0 unidades/µL; Promega) e 3,6 µL de água ultrapura. O programa da PCR na pré-amplificação foi composto de 26 ciclos de amplificação após desnaturação inicial a 94°C por 2 min. Cada ciclo foi constituído de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 56°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão). O ciclo final foi seguido de uma extensão para ação da *Taq* polimerase por 5 minutos a 72°C. Os produtos da pré-amplificação foram diluídos acrescentando-se 40 µL de água ultrapura, e armazenados a -20°C.

4.4.5 Amplificação Seletiva

Nas reações de amplificação seletiva foram utilizados 3,0 µL do produto da pré-amplificação diluído, 1,0µL do iniciador das enzimas de corte raro (E+ANN) (25 ng/µL), 1,2µL do iniciador (M+CNN) (25 ng/µL), 0,4 µL de dNTP 2,5 mM (Bioscience), 2,0 µL do tampão 10X Buffer B (Promega), 1,2 µL de

MgCl₂ 25 mM (Promega), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5 unidades/µL, Promega) e 12,5 µL de água ultrapura. O programa da PCR na amplificação seletiva consistiu de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 12 ciclos compostos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C e 1 minuto a 72°C seguidos de 23 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C e 1 minuto a 72°C. O ciclo final foi seguido de 2 minutos a 72°C. Quando as reações não foram imediatamente usadas, o armazenamento foi feito a -20°C.

Foram testadas 13 combinações de *primers* de AFLP (Tabela 2), dos quais foram selecionados 4, sendo verificado o perfil de amplificação de cada primer. A reação de amplificação seletiva foi feita realizando 3 amostras retiradas aleatoriamente dos 120 indivíduos analisados na pesquisa.

Combinações de <i>primers</i>	
E-AAC/M-CAC	E-ACA/M-CAT
E-AAC/M-CCA	E-AGC/M-CAC
E-AAC/M-CGC	E-AGC/M-CAT
E-AAC/M-CTC	E-ATC/M-CCA
E-ACA/M-CCA	E-ATC/M-CTC
E-ACA/M-CGC	E-AGT/M-CGC
E-ACA/M-CTC	

Tabela 2: Combinações de *primers* usados na amplificação seletiva. E=EcoRI e M=MseI

4.4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida (19:1) 6%, uréia 7.5 M, tampão 1X TEB) de 0,5 mm de espessura. Foi usado o sistema de gel de seqüenciamento "Sequi-Gen GT" (Biorad), com dimensões 38 x 50 cm e fonte de 2.000 V. Foram utilizados

pentes formadores de parede de 60 poços com capacidade de aproximadamente 15 μ L.

Para o preparo de 600 mL da solução matriz dos géis de poliacrilamida foram utilizados: 252 g de uréia, 60 mL de TEB 10X, 90 mL de acrilamida/bisacrilamida 40% (19:1), sendo o volume final ajustado para 600 mL com água ultrapura. A solução matriz foi filtrada e armazenada em frascos âmbar, envoltos em papel alumínio, e mantida em refrigerador.

As placas usadas na montagem do gel foram cuidadosamente limpas utilizando-se etanol 95%. Na placa maior, foram aplicados 1,5 mL de REPEL. O produto foi cuidadosamente espalhado utilizando-se lenços de papel com movimentos circulares, aguardou-se, pelo menos, 5 minutos para secagem do produto e o excesso foi retirado com lenço de papel umedecido com etanol a 95%. Para o tratamento da placa menor, foram misturados em um tubo (1,5 mL) 1 mL de etanol 95%, 5 μ L de ácido acético glacial e 5 μ L de BIND. Em seguida, o produto foi aplicado sobre a placa menor e cuidadosamente espalhado com lenços de papel em movimentos circulares. Aguardou-se a secagem do produto durante pelo menos 5 minutos e o excesso foi retirado com lenço de papel umedecido com etanol 95%.

Para o preparo de 1 gel utilizaram-se 150 mL da matriz, 150 μ L de TEMED e 800 μ L de persulfato de amônia. O TEMED e o persulfato de amônia foram adicionados imediatamente antes da aplicação da matriz entre as placas.

Ao produto da amplificação seletiva (20 μ L) foram adicionados 8 μ L de Loading buffer (formamida 98%, EDTA 10 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,002%, p/v e xileno cianol 0,002%, p/v). Para desnaturação, as amostras

foram submetidas por 5 minutos à temperatura de 95°C em termociclador e, imediatamente, colocadas em gelo e então aplicadas no gel. Para eletroforese, 15µL da amostra desnaturada foram usados.

Para ser submetido à eletroforese, o gel permaneceu *overnight* em processo de polimerização. Na parte superior da cuba foi utilizado aproximadamente 1,5 L TEB 1X e na parte inferior 350 mL de TEB 1X e 50 mL de acetato de sódio. Antes da aplicação foi realizada uma *pré-corrida* conduzida sob potência constante de 50 W durante 1 hora, para aquecimento e limpeza do gel. Após a eletroforese, os poços foram cuidadosamente limpos, usando-se uma agulha acoplada a uma seringa, e então carregados com as amostras desnaturadas. Após a aplicação das amostras, procedeu-se a eletroforese sob potência constante de 50W durante 4 horas.

4.4.7 Revelação dos géis

Para revelação dos géis, 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 1%) e mantido sob lenta agitação durante 10 minutos. Após a fixação, o gel foi lavado sob agitação em 2 L de água ultrapura durante 1 min. e, então, submetido a um pré-tratamento pela imersão em solução de oxidação (ácido nítrico 1,5%) durante 2,40 minutos.

Retirado da solução de oxidação, o gel foi lavado em 2 L de água ultrapura sob agitação durante 1 minuto e, em seguida, imerso em 3 L da solução para impregnação da prata (AgNO_3 0,2%) por 20 minutos sob agitação.

Da impregnação, o gel passou por duas lavagens de 30 segundos em 2 L de água destilada sob agitação. O gel foi então imerso em 1,5 L de solução para revelação (Na_2CO_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 1,5 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 5 minutos sob lenta agitação. Em seguida, foi feita a lavagem final em 2 L de água ultrapura sob agitação durante 1 minuto.

Os géis foram mantidos à temperatura ambiente para secar e depois foi realizada a leitura das bandas, onde apenas as bandas nítidas foram consideradas, sendo cada banda considerada com um loco genético, no qual a presença foi representada por “1” e a ausência por “0”.

As soluções de fixação, oxidação, de nitrato de prata e bloqueadora foram utilizadas para cinco revelações. As soluções foram armazenadas em frascos âmbar. Para o armazenamento e descarte, o nitrato de prata da solução de impregnação foi precipitado usando-se 10 g de cloreto de sódio.

4.6 Análise estatística dos dados

A partir da ausência ou presença de bandas amplificadas confeccionou-se uma matriz binária.

Os dados binários obtidos a partir do AFLP foram utilizados para estimar a porcentagem de locos polimórficos nas populações (LEWONTIN, 1972; ASHBURNER et al., 1997; GAUER e CAVALLI-MOLINA, 2000). A diferenciação genética intra e entre populações foi testada pela análise de variância molecular (AMOVA) utilizando o programa genes (CRUZ, 2006a).

O fluxo gênico $Nm=0.5 \ (1-GST)/GST]$ foi realizado a partir das estimativas de GST (SLATKIN e BARTON, 1989) pelo programa POPGEN versão 1.31 (YEH et al., 1999).

As distâncias genéticas de NEI (1978) foram utilizadas em uma análise de agrupamento do tipo UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method by Arithmetic Averages”), utilizando o programa TFPGA (MILLER, 2005) e o teste de bootstrap foi realizado com 1.000 permutações.

5. RESULTADOS

5.1 Extração de DNA

O protocolo de extração de DNA utilizando o detergente CTAB 2%, mostrou-se eficiente para todas as populações de *M. flexuosa*. Foi possível extrair o DNA genômico total das amostras analisadas em quantidades e qualidades satisfatórias (Figura 5).

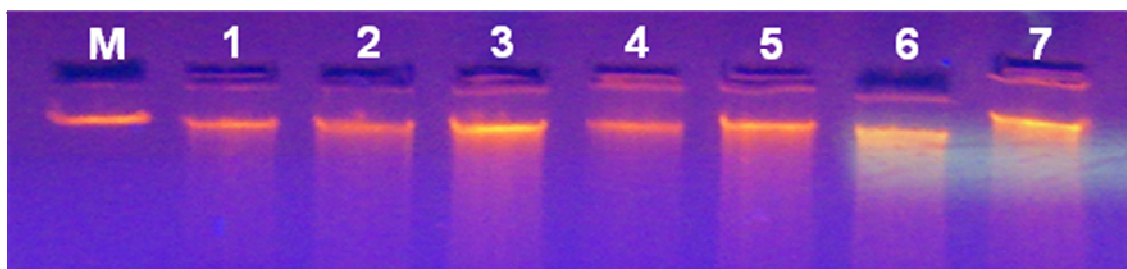


Figura 5: Quantificação de DNA de 7 indivíduos de *Mauritia flexuosa* em gel de agarose 0,8% em concentrações de 100 ng na primeira coluna. A partir da segunda coluna estão 2 μ L do DNA extraído de cada amostra.

5.2 Seleção de *primers*

Entre as 13 combinações de *primers* testados, todos mostraram-se adequados (Figura 6), produzindo fragmentos de boa qualidade, intensidade e com bom perfil de amplificação. Destes, apenas quatro combinações foram usadas neste trabalho, devido à repetibilidade, ao número de fragmentos e ao número de locos polimórficos amplificados.

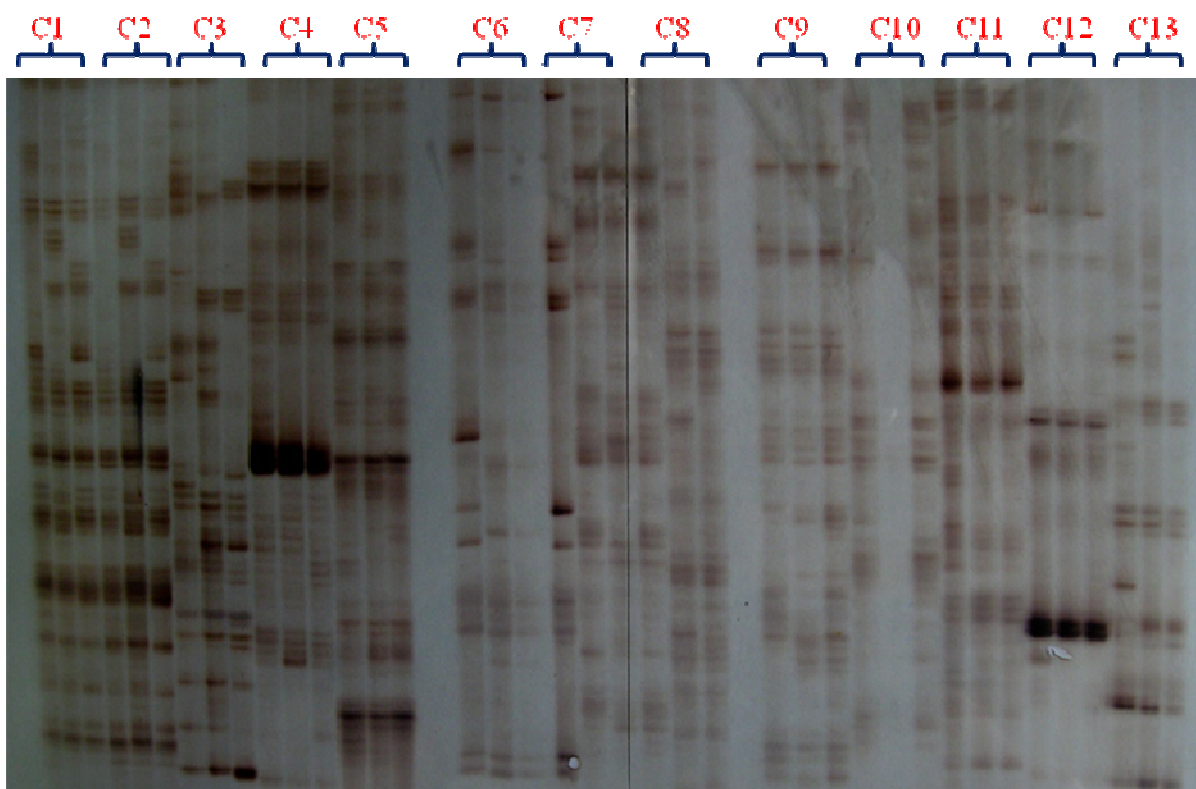


Figura 6: Gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata a 6% para as 13 combinações de *primers*.

5.3 Níveis de polimorfismos detectados pelo marcador AFLP.

As quatro combinações de *primers* geraram um total de 339 locos. A combinação que apresentou o maior número de bandas foi E-AAC/M-CAC (101), seguida das combinações E-ACA/M-CGC (88) (Figura 7) e E-AAC/M-CGC (84). O menor número de bandas foi obtido com a combinação E-ATC/M-CCA (66).

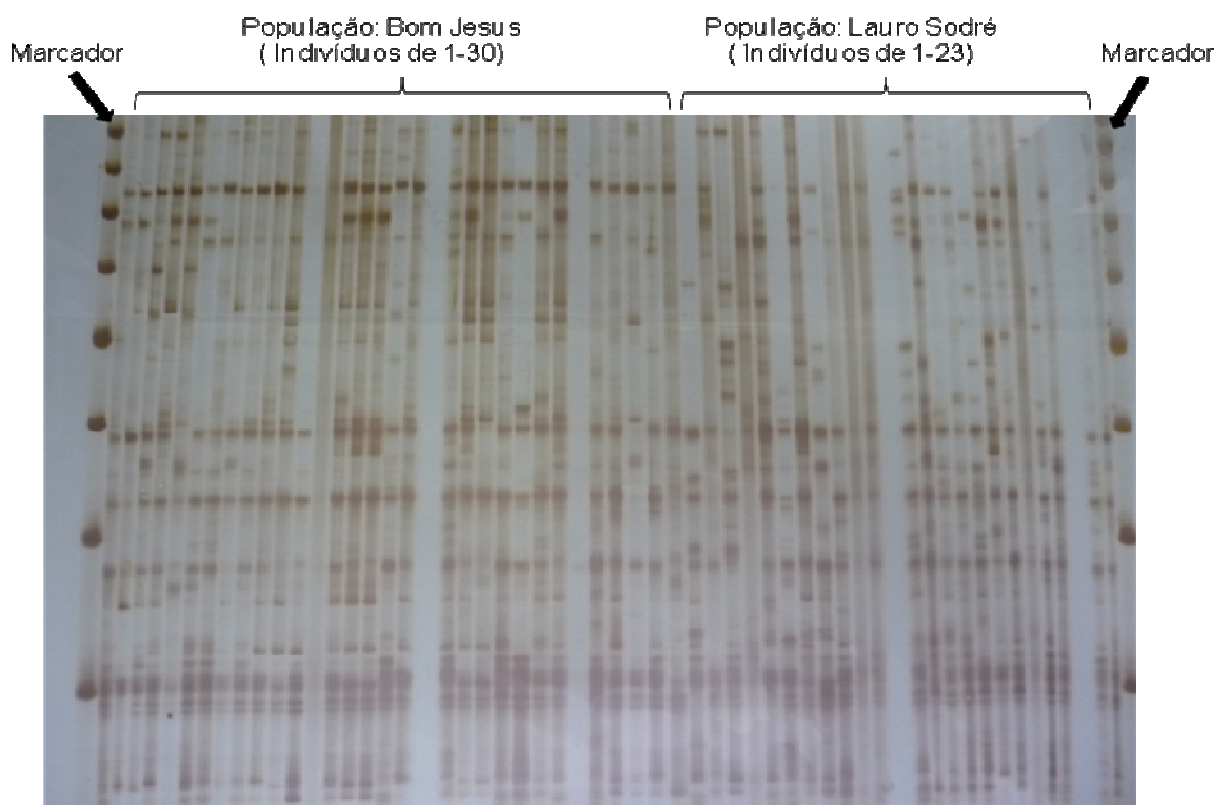


Figura 7: Gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata a 6% para a combinação E-ACA/M-CGC

A porcentagem média dos locos polimórficos detectados em cada população variou de 82% em Bom Jesus e 91,1% em Santa Luzia do Buíçuzinho. As populações de Lauro Sodré e Esperança II apresentaram níveis intermediários de polimorfismo (82,5% e 88%, respectivamente). Quando as quatro combinações foram analisadas em conjunto verificou-se que a comunidade Santa Luzia do Buíçuzinho manteve o mesmo valor de polimorfismo, enquanto as demais comunidades apresentaram pequenas variações nesses valores (tabela 3).

Combinação de Primer	Número de locos	% de locos polimórficos			
		Bom Jesus	Lauro Sodré	Esperança II	S ^{ta} . Luzia do Buiçuzinho
E-ACA/M-CGC	88	50	62.5	77.3	90.1
E-AAC/M-CAC	101	96	95	84.2	87.1
E-AAC/M-CGC	84	82.1	76.2	96.4	96.4
E-ATC/M-MCA	66	100	100	98.5	90.9
Média		82	83.4	89.1	91.1
Total	339	81.1	82.5	88	91.1

Tabela 3: Lista de combinação de primer, número de bandas detectadas e porcentagem de locos polimórficos para cada população de *Mauritia Flexuosa*.

5.4 Análise do Dendrograma

Com base na similaridade genética média, calculada para os 120 indivíduos de *M. flexuosa* analisados, verifica-se no dendrograma (Figura 8) que as populações de Bom Jesus e Lauro Sodré são geneticamente mais relacionadas entre as populações analisadas. Este resultado é sustentado por um alto valor do bootstrap.

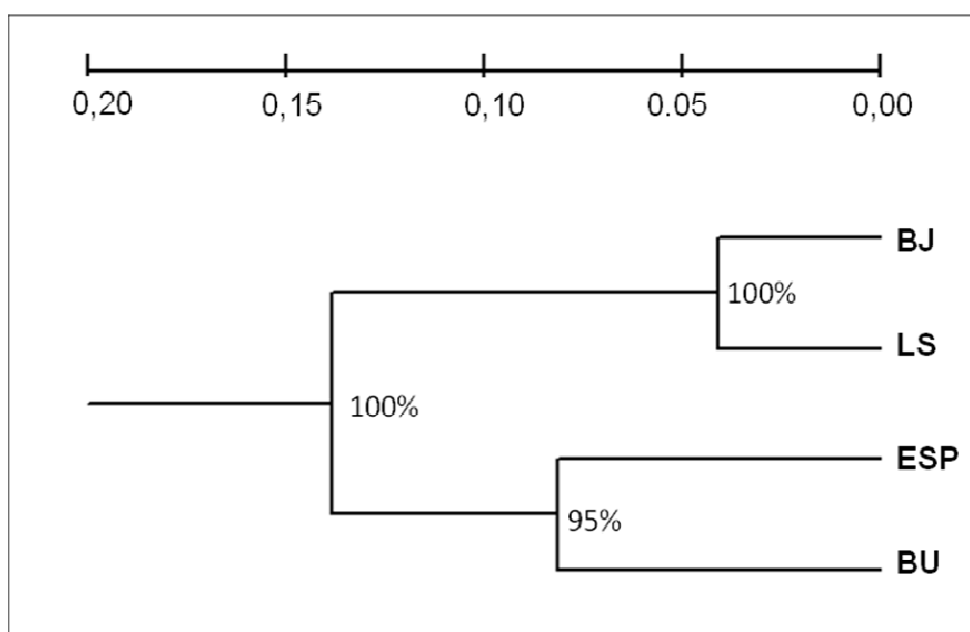


Figura 8: Dendrograma de UPGMA das populações de *Mauritia flexuosa*, calculado de acordo com a identidade genética de Nei (1978). Os números descritos nos ramos foram obtidos para o teste de bootstrap após 2.000 reamostragens.

As estimativas de distância genética de Nei (1978) e distâncias geográficas estão apresentadas na Tabela 4 e a estimativa de fluxo gênico na tabela 5.

Populações	BJ	LS	ESP	BU
BJ	*****	164	243	289
LS	0.0205	*****	79	125
ESP	0.0938	0.0786	*****	46
BU	0.0553	0.0496	0.0408	*****

Tabela 4: Matriz de distância genética e geográfica entre as 4 populações de *Mauritia Flexuosa*. Abaixo da diagonal principal estão as distâncias genéticas e acima as distâncias geográficas em Km. As siglas BJ, LS, ESP e BU correspondem, respectivamente a Bom Jesus, Lauro Sodré, Esperança II e Santa Luzia do Buiçuzinho.

Populações	BJ	LS	ESP	BU
BJ	*****			
LS	10.71	*****		
ESP	3.01	3,46	*****	
BU	4,34	4,69	5,92	*****

Tabela 5: Estimativa de fluxo gênico entre as 4 populações de *Mauritia flexuosa*. As siglas BJ, LS, ESP e BU correspondem, respectivamente a Bom Jesus, Lauro Sodré, Esperança II e Santa Luzia do Buiçuzinho.

A matriz de distância genética (Nei 1978) foi utilizada para estabelecer o nível de divergência genética entre as populações (Tabela 5). As estimativas de distância genética utilizando dados de AFLP variou de 0,0205 para as populações mais relacionados (BJ e LS), a 0,0938 para as populações mais distantes (BJ e ESP).

A média de fluxo gênico para todas as populações foi 2.99. O maior fluxo gênico ocorreu para as populações de Bom Jesus e Lauro Sodré (10,71) e o menor para as populações de Bom Jesus e Esperança II (3.01). Estes

resultados indicam ocorrer uma correlação positiva entre a distância genética e o fluxo gênico.

5.4 Diversidade genética entre e dentro das populações

Através das Análises de AMOVA (Análise de Variância Molecular), com base nos 339 locos informativos, foi possível verificar que 24.74 % da variabilidade genética está entre populações e 77.18 % se encontra entre indivíduos dentro das populações. O valor do *Fst* foi igual a 0.23, conforme visto na tabela 6, vale ressaltar que os valores foram altamente significativos a ($p < 0,001$).

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Componentes da Variação	% da Variação	<i>P</i>
Entre	3	1368	13.6601	22.82	< 0,0001
Dentro	116	5358.8667	46.1971	77.18	< 0,0001
Total	119	6726.8667	59.8572	100	
<i>Fst</i> =0.23					

Tabela 6: Resultado da análise de variância molecular (AMOVA)

6. Discussão

O padrão de distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações naturais é importante para entender o comportamento das espécies e essencial para a adoção de estratégias eficientes para a sua conservação.

Neste trabalho, a técnica de AFLP foi empregada para a detecção e caracterização da variação genética inter e intrapopulacional de *M. flexuosa*, sendo quatro populações amostradas. Os resultados obtidos possibilitam verificar o nível de polimorfismo presente nas populações. Apesar da natureza dominante dos marcadores AFLP, o grande número de locos analisados foi eficiente para determinação da estrutura genética populacional.

O número de fragmentos polimórficos utilizados na avaliação da variabilidade genética em plantas é bastante variável, independente do grau de domesticação da espécie. Neste trabalho, o número de bandas polimórficas amplificadas para cada população variou de 81,1% para a comunidade de Bom Jesus e 91,1% para a comunidade Santa Luzia do Buiçuzinho, este resultado foi superior ao encontrando por Souza (2006) para espécie *Araucaria angustifolia* e Bottino (2006) para a espécie *Calophyllum brasiliense*.

Para a espécie *Euterpe edulis* Cardoso et al. (2000) encontraram um total 429 fragmentos usando 5 pares de *primers*, destes 395 (92%) foram polimórficos. Clement et al. (2002) com o objetivo de avaliar a existência de 3 raças de pupunha, espécie domesticada, usaram 6 combinações de *primers*, gerando 245 fragmentos, dos quais 135 (55,1%) foram polimórficos, a análise confirmou a existência de duas raças e não três como era esperado. Freitas et

al. (2005), analisando a variabilidade genética de *Myracrodruon urundeuva* encontraram 137 bandas polimórficas com 3 pares de combinações. Souza (2006) avaliando a diversidade genética em *Araucaria angustifolia* identificou 683 locos para seis combinações de *primers*.

Os marcadores AFLP apresentam altos níveis de polimorfismos quando comparados com outros marcadores moleculares dominantes, como o RAPD. Estopa et al. (2006) analisou a diversidade genética de populações naturais de *Eremanthus erythropappus* com 10 pares de *primers*, dos quais apresentaram 56 fragmentos polimórficos. Oliveira et al (2007) caracterizou a diversidade genética entre acesso de *Euterpe oleracea* por meio de 28 pares de *primers* de RAPD e encontraram 263 bandas polimórficas.

Nunes et al. (2008) com o objetivo de caracterizar a variabilidade genética da espécie *Butia capitata* pertencente ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da UFPel (Universidade Federal de Pelotas) pela técnica de RAPD, utilizaram 21 pares de *primers*, onde foi produzindo um total de 136 fragmentos e destas, 77 eram bandas polimórficas, um número bastante pequeno quando comparado com o marcador AFLP.

As quatro combinações de *primers* de AFLP empregados neste estudo detectaram altos níveis de polimorfismos. Portanto, considerado suficientes para a análise em questão. O número de bandas polimórficas encontradas demonstra a existência da variabilidade genética entre e dentro das populações estudadas.

Estudos com outros tipos de marcadores são extremamente importantes, pois, dependendo da técnica utilizada, diferentes níveis de polimorfismo na população poderão ser detectados. Os marcadores

microssatélites são os marcadores de DNA que possuem altos níveis de polimorfismo, sendo necessários para evitar uma super ou subestimativa da variabilidade genética existente (Cavalli e Winge, 2003).

Genótipos de 12 indivíduos de buriti foram submetidos a testes com marcadores de microssatélites isolados de pupunha (*Bactris gasipaes*) e coco (*Cocos nucifera*), porém não se obtiveram bons resultados de amplificação, dos 100 microssatélites testados, apenas quatro foram transferidos (3 de pupunha e 1 de coco), sendo um indicativo de que existe baixa transferibilidade dos marcadores empregados entre as espécies de palmeiras, e demonstrando a necessidade de novos estudos para o desenvolvimento de microssatélites para buriti (PEREIRA, 2008).

O padrão encontrado de distribuição da variabilidade genética nas populações de *M. flexuosa* indica que a maior parte da diversidade genética encontra-se dentro das populações (72,18%). No entanto, uma quantidade significativa também foi atribuída à variação entre populações (22,82%).

Este padrão de distribuição está de acordo com o observado para as outras espécies arbóreas e com o esperado em espécies alógamas ou de sistema misto, com 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 as populações por deriva genética e seleção, reduzindo a diversidade genética entre populações (KAGEYAMA, 2003).

Os resultados obtidos nesse trabalho concordaram com diversos estudos realizados em espécies arbóreas, utilizando marcadores moleculares, que relataram que a maior diversidade genética encontra-se dentro de

populações. Em *Euterpe edulis*, verificou-se 57,4% da diversidade dentro de populações (CARDOSO et al., 2000); em *Myracrodruon urundeuva* este índice foi de 83,8% (FREITAS et al., 2005); em *Eremanthus erythropappus* foi de 79% (ESTORPA et al., 2006); em *Araucaria angustifolia* foi de 80,04% (SOUZA, 2006) e em uma espécie de Açaizeiro do gênero *Euterpe*, Oliveira e Silva (2008) encontraram índices de 75,85% para marcadores dominantes RAPD e 69,88% para marcadores co-dominante SSR.

A análise dos dados revelou um valor de diferenciação genética ($F_{st}=0,23$), semelhante ao obtido no trabalho de Nybom (2004). Este dado indica que, *M. flexuosa*, assim como outras espécies tropicais, apresenta altos níveis de diversidade intrapopulacional, com uma menor variação entre as populações. O valor de F_{st} reflete a ausência de fluxo gênico nos dias atuais, Cardoso et. al. (2000) encontrou para populações de *Euterpe edulis* um valor $F_{st}=0,42$, indicando um alto nível de diferenciação entre as populações.

Nybom (2004) com o objetivo de avaliar a diversidade intra e interpopulacional em angiospermas e gimnospermas utilizando marcadores AFLP, RAPD e ISSR. Para as análises de AFLP foi obtido um valor próximo de a 0,23 para a estimativa de diferenciação genética (F_{st}) para as espécies de ampla distribuição, que realizam fecundação cruzada, dispersão de sementes mediada por vento e/ou água, e por animais.

Um padrão parecido de diferenciação genética foi observado para outras espécies tropicais, cujos trabalhos utilizaram marcador AFLP. De acordo com Bottino (2006), que visou observar níveis de diversidade genética, a *Calophyllum brasiliense* satisfaz o critério encontrado para as espécies que

apresentam altos níveis de diversidade dentro das populações, realizam fecundação cruzada e com ampla distribuição geográfica.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível observar que populações próximas geograficamente não necessariamente são do ponto de vista genético. É possível que o padrão observado para esta espécie esteja relacionado com a sua biologia reprodutiva, que apresentam dispersão de pólen por insetos e de sementes por barocoria, zoocoria e hidrocoria, sendo esperado que o fluxo gênico através de sementes assuma uma maior importância a longas distâncias. Segundo Bawa (1999) é difícil prever padrões de fluxo gênico em espécies tropicais devido ao comportamento imprevisível do agente dispersor.

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que embora grande parte da variação genética da espécie esteja a nível intrapopulacional, há uma sensível diferenciação genética entre populações de buriti nos diferentes trechos do gasoduto Coari-Manaus. Planos de manejo e conservação de *M. flexuosa* devem observar a variabilidade genética encontrada nessas populações, visando garantir a preservação de recursos genéticos desta espécie. Para que se garanta que a grande parte da variabilidade seja preservada, populações em cada uma dessas regiões devem ser conservadas.

7. CONCLUSÕES

- A utilização de quatro *primers* de AFLP foi eficiente na caracterização de populações de *M. flexuosa*, permitindo identificar uma grande variabilidade genética, disponibilizando dados para seleção e conservação do material genético, para futuros trabalhos de melhoramento.
- A população de Santa Luzia do Buíçuzinho foi a mais polimórfica com 91,1% de polimorfismo.
- A distribuição da variabilidade genética entre e dentro revelou que 77,82% da variabilidade está distribuída dentro da população e 22,12% entre as populações.

8. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A. Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos cerrados. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1994. 38 p. (Documentos, 54).
- ASHBURNER, G. R.; THOMPSON, W. K.; HALLORAN, G. M. 1997. RAPD analysis of South Pacific coconut palm populations. **Crop Science (Madison)**, Madison, Wis., US, v. 37, p. 992-997.
- BARRAT-SEGRETAIN, M. H. 1996. Strategies of reproduction, dispersion and competition in river plants: a review. **Vegetation**, v. 123, p. 13-37.
- BAWA, K. S. 1999. Plant-pollinator interactions in Tropical rain forests. **Annu. Rev. Ecol. Systematics**, v. 21, p. 399-422.
- BOTTINO, M. C. Análise da diversidade genética de populações de *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae) utilizando marcadores AFLP. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro p. 101. 2006.
- CARDOSO, S. R. S. et al. 2000. Genetic Differentiation of *Euterpe edulis* Mart. Populations estimated by AFLP Analysis. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1753-1760.
- CAVALCANTE, P.B. Frutas comestíveis da Amazônia. Museu Paraense Emílio Goeldi. 3ª ed. CEJUP. CNPq. Museu Paraense Emílio Goeldi, Coleção Adolfo Ducke. Belém. 279 pp. 1991.
- CAVALLI, S. S.; WINGE, H. 2003. Variabilidade genética em populações naturais. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: UERGS, p. 165-176.
- CAVERS, S. et. al. 2005. Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree population. **Heredity**, v.95, p. 281-89.
- CLEMENT, C. R. et al. 2002. Use of AFLPs to distinguish landraces of Pajibaye (*Bactris gasipa*) in Brazilian Amazonia. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 4, p. 749-753.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-336.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes**: análise multivariada e simulação. Viçosa: UFV, 2006a. 175p.
- DEGEN, B. et. al. 2001a. Fine-scale spatial genetic structure of eight tropical tree species as analysed by RAPDs. **Heredity**, v.87, p. 497-507.

DE PAULA FERNANDES, N. M. Estratégias de produção de sementes estabelecimento de plântulas de *Mauritia flexuosa* L. f. (*Arecaceae*) no Vale do Acre, Brasil. **Tese de Doutorado**, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 203p. 2001.

ESTOPA, R. A. et. al. 2006. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Scientia Forestalis**, v. 70, p. 97-106.

ESTRADA, A.; FLEMING, T. H. 1986. Frugivores and seed dispersal. The Hague. W. JUNK, 346p.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATRO J. M., (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**. 131:479-491.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3ª edição. Brasília (EMBRAPA-CENARGEN). 222p. 1998.

FREITAS, M. L. M. et al. 2005. Variabilidade genética intrapopulacional em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. por marcador AFLP. **SCIENTIA FORESTALIS**. n. 68, p. 21-28.

GAJOTTO, F. A.; GRATTAPAGLIA, D.; VENKOVSKY, R. 2003. Genetic structure, mating system and long distance gene flow in Heart of Palm (*Euterpe edulis* Mart.). **Journal of hereditary**, v. 94(5), p.399-406.

GAUER, L.; CAVALLI-MOLINA, S. 2000. Genetic variation in natural populations of maté (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using RAPD markers. **Heredity: an International Journal of Genetics**, London, GB, v. 84, p. 647-656.

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. 1989. The genetic structure of tropical tree populations: associations with the reproductive biology. In: BOCK, J. E., LINHART, Y. B. (ed). *Evolutionary ecology of plants* westview. Colo: Press Boulder, p. 129-146.

HENDERSON, A. *The palmas of the Amazon*. Oxford University Press, New York. 326p, 1995.

HIRAOKA, M. 1999 Miriti (*Mauritia flexuosa*) plants and their uses and management among the ribeirinhos of the amazon estuary *In: Varzea diversity, development, and conservation of amazonia's whitewater floodplains*. **Botanical Garden Press**, New York. P. 169-186.

KAGEYAMA, P. Y. et. al. 2003. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, n. 64, p. 93-107.

LEWONTIN, R. C. 1972. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, New York, US, v. 6, p. 381-398.

LOPES, R. et al. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP): aspectos técnicos e interpretação genética. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 64-68, 2002.

MARQUES, M. C.M.; JOLY, C. A. 2000. Estrutura e dinâmica de uma população de *Calophyllum brasiliense* Camb. em floresta higrófila do sudeste do Brasil. **Revista brasileira de botânica**, São Paulo, v. 23, n.1, p. 107-112.

MILLER, M. P. **Tools for population genetics analyses 1.3**: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data, 1997. Disponível em: <http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>

MIRANDA, I. P. A. et al. *Frutos da palmeiras da Amazônia*. MCT INPA. Manaus. 120 pp. 2001.

MURRAY, M.G., THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v.8, p.1134-1137, 1980.

NASSON, J. D; HAWRICK, J. L. 1997. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of Neotropical canopy trees. **Journal of hereditary**, v. 88. p. 264-276.

NYBOM, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, v. 13. p. 1143-1155.

NUNES, A. M. et al. Caracterização molecular de butiazeiro por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v. 30, n. 3, p. 702-707.

OLIVEIRA, M. S. P.; SILVA, K. J. D. 2008. Diferenciação genética de açazeiro por marcadores RAPD e SSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v. 30, n. 2, p. 438-443.

PAIVA, J.R. Melhoramento genético de espécies agroindustriais na Amazônia: estratégias e novas abordagens. Brasília: EMBRAPA-SPI; Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 135 p. 1998.

PASSOS, M. A. B.; MENDONÇA, M. S. 2006. Epiderme dos segmentos foliares de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) em três fases de desenvolvimento. **Acta Amazônica** 36(4): 431- 436.

PEAKKAL, R.; EBERT, D.; SCOTT, L. J.; MEAGHER, P. F.; OFFORD, C. A. 2003. Comparative genetic study confirms exceptionally low genetic variation in the ancient and endangered relictual conifer, *Wollenia nobilis* (Araucariaceae). **Molecular Ecology**, Dordrecht, v. 12, p. 2331-2343.

PEREIRA, A. A. Transferibilidade de locos microssatélites de pupunha (*Bactris gasipaes*) e coco (*Cocos nucifera*) para buriti (*Mauritia flexuosa*). XVII Congresso de iniciação científica da UFAM. 2000.

PRANCE, G. T; SILVA, M. F. Árvores de Manaus. Manaus, Inpa. 311p. 1975.

RIBEIRO, J. F.; SILVA, J. C. S. Manutenção e recuperação da biodiversidade do bioma cerrado: o uso de plantas nativas. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, 8.; INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL SAVANNAS 1., 1996, Brasília. Anais... Planaltina: Embrapa-CPAC, 1996. p. 10-14.

RITLAND, K. Inferring the genetic basis of inbreeding depression in plants. **Genome**, Ottawa, v.39, p.1-8, 1996.

SEBBENN, A.M.; ETTORI, L.C. Conservação genética *ex situ* de *Esenbeckia leiocarpa*, *Myracrodruon urundeuva* e *Peltophorum dubium* em teste de progênies misto. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.13, n.22, p.201-211, 2001.

SLATIKN, M; BARTON, N. H. (1989). A comparison of three indirect methods for estimating average levels of genes flow. **Evolution**, v. 43, p. 1349-1368.

SOUZA, M. I. F. Análise da diversidade genética de populações de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze utilizando marcador AFLP. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, p.111, 2006.

SLATKIN, M. 1981. Estimating level of gene flow in natural populations. *Genetics*, v. 99, p. 323-335.

STORTI, E. F. Biologia Floral de *Mauritia Flexuosa* Lin. Fil., na região de Manaus, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica** 23(4): 371- 381. 1993.

VEKEMANS, X.; HARDY, O.Z. 2004. New insights from fine scale spatial genetic structure analysis in plant populations. *Molecular Ecology*, v. 13(4), p. 921-935.

VOS, P. et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, n. 21, p. 4407-4414.

WRIGTH, S. 1943. Isolation by distance. **Genetics**, v.8, p.114-138.

YEH, F. C.; YANG, R-C.; BOYLE, T. 1999. Microsoft Windows – based Freeware for Population Genetic Analysis. POPGEN, versão 1.31.