

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

LAURA GRACILIANA BERNARDES

DIVERSIDADE GENÉTICA DE TUCUMANZEIRO
(*Astrocaryum aculeatum* Mart.) COM MARCADORES
MICROSSATÉLITES.

MANAUS

2008

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

LAURA GRACILIANA BERNARDES

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE TUCUMANZEIRO
(*Astrocaryum aculeatum* Mart.) COM MARCADORES
MICROSSATÉLITES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais/Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Florestais e Ambientais, área de concentração: Silvicultura.

Orientadora: Profª Dra. Maria Teresa Gomes Lopes
Co-Orientador: Profª. Dra Doriane Picanço Rodrigues

MANAUS

2008

LAURA GRACILILIANA BERNARDES

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE TUCUMANZEIRO
(*Astrocaryum aculeatum* Mart.) COM MARCADORES
MICROSSATÉLITES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais/Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Florestais e Ambientais, área de concentração: Silvicultura.

Aprovado em 28 de fevereiro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof Dra Maria Teresa Gomes Lopes, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Adilson dos Santos Hara, Membro
Universidade Federal do Amazonas

Dr. Ricardo Lopes, Membro
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Aos meus pais José Carlos e Ilsa, pela dedicação e incentivo, não só na realização deste trabalho, mas em toda minha trajetória, ofereço.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** fonte de vida. Obrigada por ter colocado as pessoas certas durante trajetória.

Aos meu **PAIZÃO** e minha **MÃEZINHA**, por toda estrutura deixada em Manaus e por todo apoio dado, mesmo de tão longe.

À minha irmã **Lariel** e meu cunhado **Renato**, pelos rodízios de pizza, pelo lanche me esperando quando chegava em casa esgotada e principalmente pela companhia e carinho.

Ao meu irmão **Luquinhas**, pelo carinho, amor e conversas ao telefone que muito me incentivaram, mesmo sem querer ou ele saber.

À minha orientadora e Amiga Dra. **Maria Teresa Gomes Lopes**, pelos ensinamentos passados com carinho, pelas longas conversas sem sentido, pela confiança e incentivo ao meu crescimento profissional.

À Dra. **Doriane Picanço Rodrigues** por disponibilizar o Laboratório de Genética Vegetal e pelo apoio nas análises genéticas mesmo após a chegada do seu caçula Daniel.

Ao Dr. **Luís Antônio Contin** por abrir as portas do Laboratório de Biotecnologia na Uni Nilton Lins, confiando em mim e apoiando a etapa inicial do trabalho.

Ao meu amigo **Santiago**, pela paciência e esforço durante as viagens de coleta, sabemos que não foi fácil.

A minha aluna **Chelsea** pela dedicação e ajuda no laboratório.

À minhas mais novas amigas **Rachel** e **Liene**, pelo apoio nas extrações de DNA, por terem agüentado meus momentos de estresse e ficarem caladas enquanto muitas vezes eu chorava.

À **Ciça**, **Luna** e **Mirna**, amigas que descobri que eu tinha no fim deste árduo trabalho. Obrigada pela companhia na UFAM até tarde da noite, apoio nas PCRs e bagunças no corredor.

Ao **Cleiton Fantim**, pela companhia nas missas e almoços de domingo, e pela ajuda nos programas de análises.

À minha “irmãzinha” **Fabiola Rodrigues**, que desde a graduação muito tem me apoiado, algumas vezes de longe e outras tão de perto. Obrigada pela amizade e pelos grandes momentos que vivemos juntas.

À minhas amigas e confidentes **Luciana Leomil**, **Mary Iannuzzi**, **Larissa Muniz**, **Mayanne Ratts**, **Fabiola Farias**, **Aline Mota** e **Daniela Novaes** pelos momentos de grande

descontração e alegria, pelas “farras no apartamento”, pelas noites mal dormidas, e por compreenderem quando não pude estar presente.

Às meninas do PIATAM e hoje amigas, que mesmo sem freqüentes reuniões se fizeram presente neste último ano. **Eliene, Ioná, Ana Paula, Maely, Katinha**, muito obrigada. E à você **Tati**, meu abraço especial, obrigada pelo carinho.

À minha linda amiga e companheira de camarote **Ressizinha**, pelas discussões científicas e “papos cabeça”, pelas sextas de fofoca regadas a cerveja. Amiguinha você mora no meu coração.

Ao amigo **Rogério Añez** pelo conhecimento passado com carinho e por sua agradável companhia.

Aos colegas do Programa de pós-graduação pelos momentos de agradável convívio, em especial às amigas **Johanny, Socorro e Kellen**.

À Universidade Federal do Amazonas e ao Departamento de Ciências Florestais, incluindo professores e funcionários, pela oportunidade de realização deste trabalho e ensinamentos transmitidos.

Ao Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Laboratório Temático de Biologia Molecular (LBTM) do Instituto de Tecnologia da Amazônia (INPA) pela estrutura disponibilizada para genotipagens.

Ao CNPq, a FAPEAM e o PIATAM pelos recursos financeiro.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA

RESUMO

O tucumanzeiro (*Astrocaryum aculeatum*) é uma espécie de palmeira não domesticada com grande potencial, sendo muito apreciada pela população da região Amazônica. As populações espontâneas apresentam grande variabilidade para características como altura de planta, produção e qualidade dos frutos (tamanho, rendimento de polpa, sabor, conteúdo de fibra e óleo). Essas populações constituem-se nos recursos genéticos para uso atual ou potencial e são fonte de genes para o melhoramento genético da espécie. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a variabilidade genética de populações de tucumanzeiro na Amazônia, utilizando marcadores microsatélites. Foram coletadas trinta amostras de folhas de tucumanzeiro de doze populações (Buiuçuzinho, Urucu, Manacapuru, UFAM, Tarumã, Porto Velho, Humaitá, Manicoré, Borba, Rio Preto da Eva, Itacoatiara e Maués) e analisadas utilizando quatro *loci* microsatélites (Bg11, mBg41, mBg62 e mBg91) dos onze desenvolvidos para pupunha (*Bactris gasipaes*) e transferidos com sucesso pra tucumã. Foram detectados 48 alelos com média de 12 alelos por *locus*, sendo menor em mBg41 (8 alelos) e maior em mBg62 (15 alelos), confirmando o alto conteúdo de informação genética deste tipo de marcador para estudos genéticos em palmeiras. Os alelos foram classificados de acordo com suas frequências e distribuição entre as populações. Um total de trinta alelos foi classificado como raros (frequência < 0,05), doze alelos como intermediários (frequência entre 0,05 e 0,2), e seis comum (> 0,2). Foram detectados 13 alelos privados (presente apenas em uma população), 16 alelos esporádicos (presentes de duas a cinco populações) e 19 difundidos (presente em mais de cinco populações). A estimativa de diversidade gênica total (H_t) foi 0,68 e estimativa de diversidade gênica dentro das populações (H_s) foi 0,58 representando 85% da diversidade total. As heterozigosidades observadas (H_o) foram inferiores a heterozigosidade esperada (H_e) em 50% dos *loci*. A heterozigosidade observada foi maior em Buiuçuzinho ($H_o=0,67$) e menor no Tarumã ($H_o=0,54$). Baixa divergência genética foi observada entre as populações ($F_{st}=0,161$ e $G_{st}=0,150$). A análise da variância molecular (AMOVA) revelou que as populações estudadas de tucumã apresentam maior variabilidade genética dentro das populações (84%), e uma variabilidade menor entre as populações (16%). No entanto, foi encontrada alta diversidade genética intra-populacional que poderá ser utilizada em programas de melhoramento.

Palavras Chaves: Diversidade Genética, *Astrocaryum aculeatum*, Microsatelites, Tucumã, Populações.

ABSTRACT

The tucumanzeiro (*Astrocaryum aculeatum*) is a species of palm not domesticated and with great potential, very common and appreciated by the population of the Amazon region. The spontaneous populations present great variability for characteristics as height of plant, production and quality of the fruits (so great, pulp income, fiber flavor, content and oil). These populations consist in the genetic resources for current or potential use and are great source of genes of meaning for the genetic improvement of the species. The objective of this work was to characterize the genetic variability of populations of tucumanzeiro in the Amazônia, being used marking microsatélites. Thirty leaf samples had been collected of tucumanzeiro of twelve populations (Buiuçuzinho, Urucu, Manacapuru, UFAM, Tarumã, Porto Velho, Humaitá, Manicoré, Borba, Rio Preto da Eva, Itacoatiara and Maués) and analyzed using four loci microsatélites (Bg11, mBg41, mBg62 and mBg91) of the eleven developed for peach palm (*Bactris gasipaes*) and transferred for tucumã successfully. 48 alelos with average of 12 alelos for locus had been detected, being lesser in mBg41 (8 alelos) and greater in mBg62 (15 alelos), confirming the high content of genetic information of this type of marker for genetic studies in palms. The alelos had been classified in accordance with its frequencies and distribution between the populations. A total of thirty alelos was classified as rare (frequency < 0,05), twelve alelos as intermediate (frequency between 0,05 and 0,2), and six common (frequency > 0,2). 13 private alelos (present only in a population), 16 sporadic alelos (gifts of two the five populations) and 19 spread out had been detected (present in more than five populations). The estimate of total genic diversity (H_t) was 0,68 and estimative of genic diversity inside of the populations (H_s) he was 0,58 representing 85% of the total diversity. The observed heterozygosity (H_o) had been lower the heterozygosity waited (H_e) in 50% of loci. The observed heterozygosity was bigger in Buiuçuzinho ($H_o=0,67$) and minor in the Tarumã ($H_o=0,54$). Low genetic divergence was observed between the populations ($F_{st}=0,161$ and $G_{st}=0,150$). The analysis of the molecular variance (AMOVA) disclosed that the populations studied of tucumã present greater inside genetic variability of the populations (84%), and a lesser variability between the populations (16%). However, high genetic diversity was found intra-population that could be used in improvement programs.

Key words: Genetic Diversity, *Astrocaryum aculeatum*, Microsatelites, Tucumã, Population.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Mapa com a localização das populações onde as amostras de folhas de tucumanzeiro (*Astrocaryum acoleatum*) foram coletadas..... **23**
- Figura 2-** Visualização da quantificação das amostras de DNA de 8 indivíduos de *Astrocaryum aculeatum* em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (colunas de 4 a 11). As colunas de 1 a 3 indicam, respectivamente os marcadores de peso molecular 50, 100 e 200 ng..... **27**
- Figura 3-** Histograma de distribuição das frequências alélicas de quatro loci microssatélites nas populações de tucumanzeiro (*Astrocaryum aculeatum*)..... **29**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Características de 4 locos microssatélites transferidos com sucesso para tucumã e utilizados na realização deste trabalho.....	25
Tabela 2-	Classificação do número de alelos de acordo com sua frequência e distribuição entre amostras de Tucumã (<i>Astrocaryum aculeatum</i>) de dose populações considerando quatro microssatélites.....	28
Tabela 3-	. Índice de diversidade genética para os quatro <i>loci</i> do conjunto,. A – Número de alelos; H_o – Heterozigosidade observada; H_e – Heterozigosidade esperada; H_e^* não significativo a $p > 0,05$	30
Tabela 4-	Índices de diversidade genética, de quatro <i>loci</i> microssatélites para amostras de tucum (<i>Ástrocaryum aculeatum</i>) de doze populações. A – Número de alelos; P – Número de Alelos Privados; H_o – Heterozigosidade observada; H_e – Heterozigosidade esperada *Equilíbrio de Hardy Weinberg não significativo a $p > 0,05$	31
Tabela 5-	Valores em porcentgem das variabilidades intrapopulacional e interpopulacional, e diferenciação genética (F_{ST}) das doze populações de tucumã (<i>Astrocaryum aculeatum</i>) para cada um dos <i>loci</i> microssatelites.....	32
Tabela 6-	Matriz de divergência (F_{ST}) entre amostras de tucuma (<i>Astrocaryum aculeatum</i>) de doze populações (Pop: 1. Porto Velho, 2. Humaitá, 3. Manicoré, 4. Borba, 5. Urucu, 6. Buiuçzinho, 7. Manacapuru, 8. Itacoatiara, 9, Rio Preto da Eva, 10. Maués, 11. UFAM, 12 Tarumã) considerando quatro <i>loci</i> microssatélites; valores de F_{ST} $p < 0,05$	36

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	11
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
1.1. Classificação Taxonômica.....	13
1.2. Descrição da Espécie.....	13
1.3. Centro de Origem e Domesticação do <i>Astrocaryum aculeatum</i>	14
1.4. Ecologia da Espécie.....	15
1.4.1. Fenologia	15
1.4.2. Dispersão.....	15
1.4.3. Germinação das Sementes.....	15
1.4.4. Sistema Reprodutivo.....	16
1.5. Importância da Espécie.....	16
1.6. Marcadores Moleculares em Estudos de Genética e Melhoramento de Plantas	17
1.7. Marcadores Microssatélites.....	20
2. MATERIAL e MÉTODOS.....	23
2.1. Coleta do Material.....	23
2.2. Extração do DNA.....	24
2.3. Quantificação do DNA.....	24
2.4. Amplificação dos <i>Loci</i> Microssatélites.....	24
2.5. Análise Genética dos Dados.....	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
3.1. Extração do DNA.....	27
3.2. Diversidade Alélica dos <i>Loci</i> Microssatélites.....	27
3.3. Diversidade Genética Entre e Dentro das Populações.....	32
4. CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

INTRODUÇÃO

As palmeiras são ricas em espécies e em tipos biológicos, constituindo-se ótimos marcadores ecológicos e desempenhando um papel essencial no funcionamento dos ecossistemas florestais (KAHN e MOUSSA, 1994). São ainda emblemáticas dos trópicos, abundantes, produtivas, e foram muito importantes na subsistência de povos indígenas. Algumas espécies ainda são importantes na subsistência de populações tradicionais (CLEMENT *et al.*, 2005) e outras atingiram o status de "commodities" apresentando importante contribuição para a economia de dezenas de países tropicais, sendo hoje o dendê, a principal fonte de óleo vegetal no mundo (FEDEPALMA, 2006; OIL WORLD, 2005; USDA, 2006).

O Brasil possui riquíssima flora palmácea, cujos estudos sistemáticos iniciaram no final do século XVIII (BONDAR, 1964) e os estudos sobre a importância econômica das palmeiras no início do século XX. As palmeiras de maior importância econômica no Brasil são espécies exóticas; côco e dendê, espécies já introduzidas, domesticadas e com desenvolvimento científico e tecnológico. As palmeiras tropicais nativas da Amazônia e de outras regiões tropicais da América Latina também tem sido objeto de pesquisa e desenvolvimento desde o final da década de 1970, algumas atingiram o mercado moderno e outras não obtiveram sucesso (CLEMENT *et al.*, 2005).

No caso das palmeiras nativas da Amazônia, embora com grande potencial para o desenvolvimento agrícola da região, a maior parte encontra-se em condição selvagem ou semi-selvagem e não existem sementes melhoradas e nem sistemas de produção recomendados para o plantio.

O tucumanzeiro (*Astrocaryum aculeatum*), por exemplo, é uma espécie com grande potencial (CLEMENTE *et al.*, 2005) e ainda não domesticada, muito comum e apreciada pela população da região Amazônica. A espécie ocorre comumente em áreas descampadas, com solos pobres e degradados (FAO, 1987; LORENZI *et al.*, 1996). A polpa do seu fruto é muito apreciada pela população da região como alimento, sendo consumida tanto *in natura* pura ou como recheio de pães e tapioca, e também processada na forma de sorvetes ou patês (COSTA, 2001; COSTA e VAN LEUWEN, 2002). O tucumã possui potencial a ser explorado, pelo número importante de produtos industrializáveis que pode gerar (BRANCO, 1977). Além disso, trata-se de uma cultura perene e alternativa de grande potencial para o desenvolvimento agrícola sustentável da região com benefícios sociais, econômicos e ambientais.

A exploração da espécie é quase que exclusivamente extrativista, as populações espontâneas apresentam grande variabilidade para características como altura de planta, produção e qualidade dos frutos (tamanho, rendimento de polpa, sabor, conteúdo de fibra e óleo). Essas populações constituem-se nos recursos genéticos para uso atual ou potencial e são a fonte de genes de grande significado para o melhoramento genético da espécie.

A variabilidade genética é base para qualquer programa de melhoramento (RODRIGUES, 2007). Portanto conhecer os níveis de distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações de tucumanzeiro subsidiará os planos de uso e conservação dos recursos genéticos da espécie e o estabelecimento de um banco de germoplasma, além de direcionar as etapas dos programas de melhoramento.

Entre os marcadores moleculares para estudos de diversidade genética, destacam-se os Microssatélites (SSR). Os locos microssatélites possuem expressão co-dominante, são altamente multialélicos, e exibem herança mendeliana, caracterizando esta classe de marcadores moleculares como a de mais alto conteúdo de informação de polimorfismo (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). Por suas características, os microssatélites apresentam um alto poder de discriminação individual, o que os torna uma poderosa ferramenta em estudos sobre análise de parentesco, fluxo gênico e estrutura genética populacional (CHASE *et al.*, 1996; RAFALSKI *et al.*, 1996). Para avaliar variabilidade e heterozigosidade, os marcadores microssatélites são mais eficientes que os marcadores dominantes (RAPD e AFLP), pois possibilitam a distinção entre o homozigoto e o heterozigoto.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a variabilidade genética de populações de tucumanzeiro na Amazônia, utilizando marcadores microssatélites, visando orientar estratégias de exploração, melhoramento e conservação a longo prazo.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Classificação Taxonômica

A espécie *Astrocaryum aculeatum* apresenta a classificação taxonômica: reino Plantae (Vegetal), divisão Magnoliophyta (Angiospermae), subdivisão Liliopsida, classe Monocotiledoneae, família Arecaceae, subfamília Arecoideae, tribo Cocoeae, subgênero Bactridinae, gênero *Astrocaryum* e espécie *Astrocaryum aculeatum* G. Mayer (sinônimos *Astrocaryum tucuma* Mart., *Astrocaryum aureum* Griseb. e H. Wendl, *Astrocaryum princeps* Barb. Rodr, *Astrocaryum caudescens* Barb. Rodr, *Astrocaryum manoense* Barb. Rodr e *Astrocaryum macrocarpum* Huber) (<http://www.epalmetum.com>).

Apresenta os nomes vulgares: Tucumã, Tucumã-açu (Brasil); Star-nut palm, Tucum palm, Tucuma (Inglês); Tucum (Francês); Tackoeman, Waran (Suriname); Chambira (Colômbia); Kuru (Guiana); Hericungo (Peru) e Pi ci xing guo zong (Chinense) (<http://www.epalmetum.com>).

1.2 Descrição da Espécie

O Tucumã apresenta estipe solitário, ereto, medindo de 10 a 25 m de altura e de 30 a 45 cm de diâmetro, sendo guarnecido de espinhos negros, finos, longos e pungentes. As folhas pinadas chegam a medir 5 m de comprimento e apresentam espinhos por toda sua extensão, embora sejam mais freqüentes na bainha (CAVALCANTE, 1991; HENDERSON e SCARIOT, 1993; KAHN e MILLÁN, 1992; QUEIROZ, 1996).

A inflorescência ereta mede até 2 m de comprimento, tendo as flores femininas mais concentradas na parte basal das ráquias do espádice, e as masculinas, em maior quantidade, ocupando o restante de cada ráquila. (CAVALCANTE, 1991; HENDERSON e SCARIOT, 1993; KAHN e MILLÁN, 1992; QUEIROZ, 1996).

Os frutos são drupas subglobosas a elipsóides, medindo entre 4,5 e 6 cm de comprimento, pesando em torno de 70 gramas. O epicarpo é liso e duro, possui coloração verde-amarelada e mede em torno de 1,5 mm de espessura; o mesocarpo mede cerca de 8 mm de espessura, é compacto, firme, levemente fibroso, oleaginoso e de coloração amarelada ou alaranjada; o endocarpo é negro, consistente, lenhoso, medindo entre 2 e 5 mm de espessura (CAVALCANTE, 1991; KAHN e MILLÁN, 1992; QUEIROZ, 1996).

As sementes de tucumã são globulares, oblongas e raramente elipsóides, medem cerca de 4 cm de diâmetro e pesam 22 a 53 g (MENDONÇA, 1996). As sementes de tucumã são recalcitrantes, o que constitui um problema para o armazenamento, a propagação sexuada é até o momento o único meio de reprodução da espécie (GENTIL e FERREIRA, 2005).

1.3 Centro de Origem e domesticação do *Astrocaryum aculeatum*

Provavelmente a espécie é originada no Amazonas e encontram-se distribuída na Venezuela, Trinidad, Guianas, Bolívia, Colômbia, Peru e no Brasil. Entre os estados brasileiros, pode ser encontrada no Acre, Amazonas, Mato Grosso e Rondônia (SOUZA, 1996).

Os estudos de origem e distribuição de *A. aculeatum* relatam que esta palmeira é uma cultura pré-colombiana, de ampla distribuição, que ocorre com frequência na Amazônia Oriental, onde está localizado um dos importantes centros de diversidade do gênero *Astrocaryum* (LLERAS *et al.*, 1983).

Ocorre em vegetação secundária (capoeiras), savanas, pastagens e roçados, sendo excepcionalmente tolerante a solos pobres e degradados (CAVALCANTE, 1991; FAO, 1987).

Na mata fechada podem existir até 10 plantas adultas por hectare. Nas capoeiras e pastos, onde originalmente há apenas 1 ou algumas poucas palmeiras, a cutia e o fogo ajudam na formação de novos grupos de tucumanzeiro. O tucumanzeiro adulto ocorre duas vezes mais na capoeira que na floresta fechada (SOUZA *et al.*, 1996). É comum ser encontrado em vegetação secundária (capoeira) ou em descampados com solos pobres e degradados, onde chega a uma densidade de 50 indivíduos por hectare (KAHN, 1994; 1995).

O tucumã é ainda uma espécie não domesticada, sendo, portanto raramente encontrada em plantios comerciais, mas podem ocorrer alguns plantios com mais de 100 pés adultos por hectare (SOUZA *et al.*, 1996). Segundo Clemente (1999), o tucumã provavelmente foi semi-domesticado na época do contato, e define uma espécie semi-domesticada como sendo aquela que tem sido modificada de forma significativa pela seleção e intervenção humana. O autor supõe ainda que quanto maior o nível de domesticação de uma população menor é sua variabilidade genética.

No desenvolvimento de um plano de domesticação *in situ* para o tucumã perto de Manaus, Schroth *et al.* (2004) eliminaram 5% das piores plantas (não produtivas e de baixa qualidade) em uma propriedade e melhoraram a qualidade da população em 14% sem

comprometer a produção da população. Quanto maior a eliminação, mais rápido o melhoramento da qualidade da população e melhor a qualidade média das progênies oriundas das matrizes elites.

1.4 Ecologia da Espécie

1.4.1 Fenologia

Em Manaus, o período de floração estende-se de julho a janeiro, o da frutificação, de fevereiro a agosto, com pico em abril (MOUSSA e KAHN, 1996, 1997). Cada indivíduo produz de dois a sete cachos por ano (MOUSSA e KAHN, 1996, 1997). Outro pico de frutificação, menos freqüente, foi encontrado por KAHN (1994) nos meses de outubro e novembro.

1.4.2 Dispersão

O padrão de dispersão primária da espécie consiste na chuva de sementes, geralmente concentrada no raio de projeção da copa (3,5 m). A dispersão secundária é feita por cutias (*Dasyprocta* sp.), que depositam sementes nas proximidades das plantas, em distâncias inferiores a 15 m (BACELAR e PESSONI, 2000).

A ocorrência em fazendas, sítios e quintais está geralmente associada à dispersão natural e à dispersão involuntária feita pelo homem e, ainda, à manutenção de plantas jovens e adultas, mesmo em áreas destinadas a pastagens (SOUZA *et al.*, 1996).

1.4.3 Germinação das Sementes

O processo germinativo do tucumã não foi completamente descrito, bem como não foram identificadas as estruturas das plântulas em formação. Os métodos e as técnicas de produção de mudas são insuficientes e precários, o que provavelmente contribui para desestimular o estabelecimento de plantios da espécie. Na natureza a germinação pode ocorrer em até dois anos (GENTIL e FERREIRA, 2002).

Segundo Gentil e Ferreira (2002), a germinação das sementes de tucumã é do tipo adjacente ligulada, com tempo médio de emergência do pecíolo cotiledonar de 104 dias e de completa expansão da primeira folha bífida de 236 dias. Pode ainda ser classificada como

criptocotiledonar, devido à permanência do limbo cotiledonar dentro da semente, e hipógea pelo fato da semente se manter sob o nível do substrato durante o processo germinativo.

1.4.4 Sistema Reprodutivo

O tucumã é uma espécie monóica, ou seja, os indivíduos apresentam os dois sexos na mesma planta, porém possui separação morfológica (as flores masculinas ficam bem separadas das femininas). Este mecanismo tem o objetivo de evitar a auto-fecundação. Esta característica, aliada a protoginia, mas com sobreposição das fases sexuais (BACELAR-LIMA *et al.*, 2003); indicam que a espécie seja predominantemente alógama, mas somente estudos moleculares podem informar com segurança o seu sistema reprodutivo.

1.5 Importância da Espécie

A capacidade que o tucumanzeiro apresenta de explorar solos pobres e a ausência de pragas e doenças sugerem que essa planta poderia ter sucessos se cultivada como fonte de óleo. Apresenta também características sensoriais agradáveis, que o caracteriza como matéria comestível de valor potencial para a indústria alimentícia (CHAVES, 1947; CRUZ *et al.*, 1984; LIMA, 1986).

O tucumã também pode ser uma alternativa agrícola econômica para terras que hoje são consideradas improdutivas e pode ser um substituto para áreas onde as espécies de açaí, *Euterpe oleracea*, foram eliminadas (CORADIN, 1990; PRANCE, 1987). Em plena safra, um vendedor de tucumã ganha de 100 a 200 reais por semana, nos três dias de feira. Compra-se esse fruto por cento, e o preço depende do tamanho, espessura e qualidade da polpa. Em sítios compra-se por milheiro e é vendido entre 5 a 18 reais, quando os frutos são vendidos no varejo rendem até 87 reais no início de safra e o milheiro pode quadruplicar (SOUZA *et al.*, 1996).

Todas as partes do tucumanzeiro podem ser utilizadas pelo homem. O fruto é consumido *in natura* e na forma de sorvete, suco, licor ou doce; e exerce um papel importante na nutrição da população amazônica. A polpa representa 22% do peso do fruto, contém 9% de proteína e 55% de óleo (SOARES, 2005). É rica em ácidos graxos, proteínas e provitamina A e B (CHAVES, 1947), sendo a ingestão diária de dois tucumãs suficiente para atender a demanda dessa vitamina A pelo organismo adulto.

O endocarpo (caroço) serve pra alimentar animais domésticos e na defumação da borracha. É empregado pelos artesãos na confecção de brincos, anéis, pulseiras, colares e outros artefatos. Os índios Apurinã dizem que a casca preta do tucumã possui propriedades energéticas (SOUZA *et al.*, 1996).

O estipe, bastante resistente, é utilizado na construção de cercas, currais e casas rústicas. Das folhas retiram-se fibras finas e resistentes, empregadas na confecção de redes para pesca e descanso, linhas para arco de flecha, cestos e balaios (KAHN, 1994 ; MOUSSA e KAHN, 1996, 1997; SOUZA *et al.*, 1996). São também utilizados domesticamente nas formas de adornos ou revendidos nas lojas de artesanatos (KAHN, 1994).

1.6 Marcadores Moleculares em Estudos de Genética e Melhoramento de Plantas

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), marcadores moleculares são todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou ainda uma seqüência direta da estrutura do DNA. Quando o comportamento de um marcador molecular, quanto à segregação, segue os padrões mendelianos de herança, este marcador é definido como "marcador genético".

A partir da década de 70, com o advento das técnicas de biologia molecular, dentre as quais se destaca a PCR (*Polymerase Chain Reaction*), foram desenvolvidos vários métodos de detecção de polimorfismo genético ao nível do DNA. Tais técnicas viabilizaram o surgimento de um número ilimitado de marcadores moleculares para a caracterização genética de indivíduos, populações e espécies (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

A PCR é uma técnica que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase (MULLIS, 1983). A reação de PCR se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídios (*primers*), que são pequenas moléculas de DNA de fita simples, as quais delimitam a seqüência da fita de DNA alvo da amplificação. Os *primers* são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências sejam complementares às seqüências específicas que margeiam a região alvo (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Dentre os primeiros marcadores de DNA desenvolvidos para análise de variabilidade genética destacam-se os marcadores RAPD (WELCH e MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS, 1990). RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) é um marcador dominante, tipicamente usado em programas de melhoramento, análise da diversidade genética em populações naturais e caracterização de bancos de germoplasma (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Diferente dos marcadores RAPD, outros marcadores amplificam seqüências específicas dos genomas, como a ferramenta CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*) ou PCR-RFLP (PCR – *Restriction Fragment Length Polymorphism*), que tem como base a clivagem de fragmentos amplificados com primers universais, utilizando-se diferentes enzimas de restrição (GLAUBITZ e MORAN, 2000). Essa técnica tem sido freqüentemente utilizada, para analisar os padrões filogeográficos, com base no genoma do cloroplasto, em espécies de plantas inclusive as tropicais (BERNARDES *et al.*, 2003; CARON *et al.*, 2000; CAVERS *et al.*, 2003; DEMESURE *et al.*, 1996; DUMOLING-LAPEGUE *et al.*, 1997; DUTECH *et al.*, 2000; EL MOUSADIK e PETIT, 1996; KING e FERRIS, 1998; LAVIN *et al.*, 1991).

Também entre os marcadores que amplificam regiões específicas dos genomas destacam-se os microssatélites, também conhecidos como SSRs (*Simple Sequence Repeats*), que são marcadores de DNA altamente polimórficos e, portanto, bastante informativos para aplicação em estudos sobre variação genética em populações naturais (RAFALSKI *et al.*, 1996). Os locos microssatélites são co-dominantes e apresentam elevada diversidade alélica, devido às altas taxas de mutação (MORGANTE e OLIVIERA, 1993). Devido a essas características, os microssatélites constituem ferramenta ideal para análise de estudos de parentesco, fluxo gênico, mapeamento, sistemas de acasalamento e estudos sobre os padrões e níveis de organização da variabilidade genética (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). As informações geradas por esses marcadores contribuem diretamente nos estudos de estrutura genética em populações (variação genética dentro e entre as populações) e portanto, para o delineamento de estratégias de conservação, melhoramento e manejo sustentado (KAGEYAMA *et al.*, 2003).

De modo geral, as espécies de plantas tropicais mantêm maior parte da variabilidade genética dentro das populações e uma heterogeneidade considerável para os níveis de variação interpopulacional, além de um sistema de cruzamento misto (HAMRICK, 1983; HAMRICK e GODT, 1990; KAGEYAMA e GANDARA, 1993; KAGEYAMA *et al.*, 2003). Esses níveis são mantidos em função de fatores como o sistema reprodutivo, fluxo gênico, níveis de endogamia, seleção natural e deriva genética de uma determinada espécie (KAGEYAMA, 1990; RICHARDS, 1986).

A quantificação da variabilidade genética intrapopulacional tem sido realizada em termos de números de alelos por *locus* (*A*), percentagem de *loci* polimórficos (*P*), heterozigosidade observada (*Ho*) e esperada (*He*) sob equilíbrio de Hardy Weinberg e índice de fixação (*f*) (HAMRICK, 1983). Estas estimativas caracterizam e comparam os níveis de

diversidade genética dentro de cada população. Além disso, o índice de fixação (f) tem sido utilizado como uma medida de desvios do equilíbrio de Hardy Weinberg dentro de cada população (RODRIGUES, 2007).

Para caracterizar a estrutura genética de populações três metodologias têm sido empregadas: estatísticas F , que fornecem os índices de fixação de alelos para o total das populações, média dentro e entre populações, com base em medidas de probabilidade de identidade por descendência (NEI, 1977; WRIGHT, 1965); a análise de variância das frequências gênicas, que distribui a variabilidade genética em diversos níveis hierárquicos, considerando o processo amostral nas estimativas (COCKERHAM, 1969; WEIR, 1996); e a análise da diversidade gênica em populações subdivididas, que fornece, a partir de uma metodologia estatística simples, a proporção da variabilidade genética contida entre e dentro das populações e os níveis de heterozigosidade esperados para o total e a média das populações (NEI, 1973; 1977; 1987). Segundo Reis (1996), todas as três metodologias apresentam bases genéticas similares e são complementares quanto ao significado biológico, especialmente se os marcadores forem neutros, a amostragem aleatória e as populações forem originadas de uma única população ancestral.

Outra abordagem que irá auxiliar no entendimento da estrutura genética é a obtenção de informações sobre o sistema de reprodução da espécie, que determina como a informação genética é transferida de uma geração para outra (WRIGHT, 1921), permitindo entender a maneira como a variabilidade genética se organiza no espaço e no tempo.

A disponibilidade de dados de marcadores moleculares para diversas populações ou genótipos também permite o estabelecimento de estimativas de similaridade ou distâncias genéticas, que normalmente é proporcional ao tempo de divergência dos genótipos em relação a um ancestral comum (WEIR, 1996). De acordo com Milach (1998) é possível separar os estimadores de distância genética em dois grandes grupos: a) as distâncias geométricas, destacando as distâncias de Roger modificada, o índice de similaridade de Nei e Li, e a estimativa de distância D de Barbosa Neto *et al.* (1997), as quais variam de zero a um, o que facilita a interpretação dos resultados; b) as distâncias que requerem pressuposições genéticas, das quais a mais empregada é a distância de Nei, que mede as proporções de genes iguais entre e dentro de populações e é diretamente proporcional ao tempo de divergência das duas populações sob comparação. Apesar de ser utilizada em diversos trabalhos, esta distância não é a melhor opção para estudos visando o melhoramento de plantas, uma vez que pode variar de zero ao infinito; desta forma sua interpretação não é direta, podendo gerar confusões na comparação de diferentes genótipos (RODRIGUES, 2007).

A síntese de informações sobre a diversidade e a estrutura genética das populações, as estimativas das taxas de cruzamento e as relações genéticas poderão ser usadas para estabelecer estratégias de seleção de genótipos superiores e manutenção da variabilidade genética para uso em programas de melhoramento e conservação (MILACH, 1998).

Em plantas perenes, estes marcadores têm sido usados para avaliar a grau de heterozigosidade complementar em matrizes usadas para cruzamentos que buscam vigor híbrido (GRATTAPAGLIA, 1999). Para esta finalidade, os microssatélites serão mais eficientes que os RAPDs e os AFLPs, pois possibilitam a distinção entre o homozigoto e o heterozigoto.

A utilização da divergência genética para orientar a escolha dos genitores a serem inter cruzados em programas de melhoramento visa obter maior efeito heterótico nas populações híbridas. Em espécies alógamas, a caracterização de linhagens em grupos heteróticos é de fundamental importância na escolha dos genitores para a obtenção de híbridos com elevado desempenho agrônômico. Medidas de distância genética por meio de RFLP têm sido utilizadas na classificação de linhagens de milho em grupos heteróticos, bem como a alocação de novas linhagens de origem desconhecida nos diferentes grupos (LIVINI *et al.*, 1992). A correlação entre as distâncias genéticas e a heterose para características importantes tem sido observada em canola (*Brassica napus*) (ALI *et al.*, 1995) e em mostarda (*Brassica sinapis*) (SEKHON e GUPTA, 1995).

1.7 Marcadores microssatélites

Microssatélites são marcadores moleculares altamente polimórficos, revelando-se entre as categorias de marcadores, os mais informativos para estudos da variação genética em populações naturais (RAFALSKI *et al.*, 1996). Consistem em pequenas seqüências de DNA compostas de repetições de 1 a 6 nucleotídeos encontradas com frequência e amplamente distribuídas no genoma de eucariotos (LITT e LUTY, 1989; TAUTZ e RENZ, 1984). Os locos microssatélites são codominantes, ou seja, ambos os alelos são visualizados num indivíduo heterozigoto; apresentam elevada diversidade alélica, devido às altas taxas de mutação, e contêm muitas informações de polimorfismo. Devido a essas características, os microssatélites são uma ferramenta ideal para análise de estudos de parentesco, genética populacional, mapeamento de genes, sistemas de acasalamento (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998) e do nível e manutenção da diversidade genética (CIAMPI *et al.*, 2000).

Atualmente existem diversos marcadores moleculares desenvolvidos para espécies florestais tropicais, como por exemplo, para *Carapa guianensis* (VINSON *et al.* 2005), *Manilkara huberi* (AZEVEDO *et al.* 2005), *Ceiba pentandra* (BRONDANI *et al.*, 2003), *Copaifera langsdorffii* (CIAMPI *et al.*, 2000), *Caryocar brasiliensis* (COLLEVATTI *et al.*, 1999), *Swietenia macrophylla* (LEMES *et al.* 2002), *Swietenia humilis* (WHITE e POWELL, 1997a) e *Symphonia globulifera* (ALDRICH *et al.*, 1998), incluindo palmeiras *Cocos nucifera* (PERERA *et al.* , 1999; RIVERA *et al.*, 1999), *Euterpe edulis* (GAJOTTO *et al.*, 2001), *Elaeis guineensis* e *E. Oleifera* (BILLOTTE *et al.*, 2001), *Oenocarpus bacaba* (LEPSCH-CUNHA, 2003), *Phoenix dactylopera* (ZEHDİ *et al.*, 2004) e *Bactris gasipaes* (BILLOTTE *et al.*, 2004; MARTÍNEZ *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2004). Todos estes trabalhos demonstram que *locis* SSRs são altamente multi-alélicos e informativo para estudo de estrutura genética de populações, permitindo estimar com precisão heterozigosidade, distância genética, relações de parentesco e fluxo gênico.

O processo de desenvolvimento de novos locos microsatélites é exaustivo e dispendioso, no entanto essa classe de marcadores moleculares nos dá a possibilidade de transferibilidade de *loci* entre espécies do mesmo gênero e entre espécies da uma família, considerando a hipótese de que espécies filogeneticamente próximas apresentam homologia das seqüências flanqueadoras aos *loci* microsatélites (COLLEVATTI *et al.*, 1999 ; DAYANANDAN *et al.*, 1997; WHITE e POWELL, 1997b), o que aumenta significativamente a relação custo/benefício na utilização desta tecnologia. Dessa forma, é de extrema importância que estudos que caracterizem a transferibilidade desses marcadores entre espécies tropicais sejam realizados.

Marcadores microsatélites desenvolvidos para *Theobroma cacao* foram testados em três espécies do gênero e verificou-se a transferibilidade com sucesso de sete *loci* polimórficos (FARIA *et al.*, 2001). Outro exemplo foi a transferência com sucesso de microsatélites desenvolvidos para *Caryocar brasiliense* (COLLEVATTI *et al.*, 1999), uma árvore dos cerrados do Brasil Central, para *Caryocar villosum*, uma árvore emergente da floresta amazônica (MARTINS, 2002). Os resultados obtidos por Dayanandan *et al.* (1997) indicam em Leguminosas que os locus SSR podem ser bem conservados entre os taxos, possibilitando assim a transferibilidade. Os resultados encontrados por Brondani *et al.* (1998) são similares para o gênero *Eucalyptus*.

A transferibilidade de *loci* SSR para palmeiras foi testada por Billotte *et al.* (2001), os autores desenvolveram SSR pra *Elaeis guineensis* e transferiram com sucesso para *E. oleifera*

e *E. Odora*. A transferibilidade para espécies de outros gêneros (*Cocus*, *Syagrus*, *Maximiliana*, *Astrocaryum*, *Bactris*, *Euterpe*, *Oenocarpus*, *Mauritia* e *Phoenix*) também foram analisadas por estes autores e o sucesso na transferência diminuía a medida que as espécies se distanciavam dentro do taxa ou da família.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do Material

Foram estudadas 12 populações espontâneas de tucumã (Figura 1), cada uma com 30 indivíduos, totalizando 360 amostras. No Rio Solimões foram estudadas populações de Tefé, duas de Coari (Buiçuzinho e Urucu), Manacapuru e duas de Manaus (mini-campus da UFAM e Tarumã); no Rio Madeira as populações de Porto Velho, Humaitá, Manicoré e Borba; no Rio Amazonas as populações de Rio Preto da Eva, Itacoatiara e Maués.

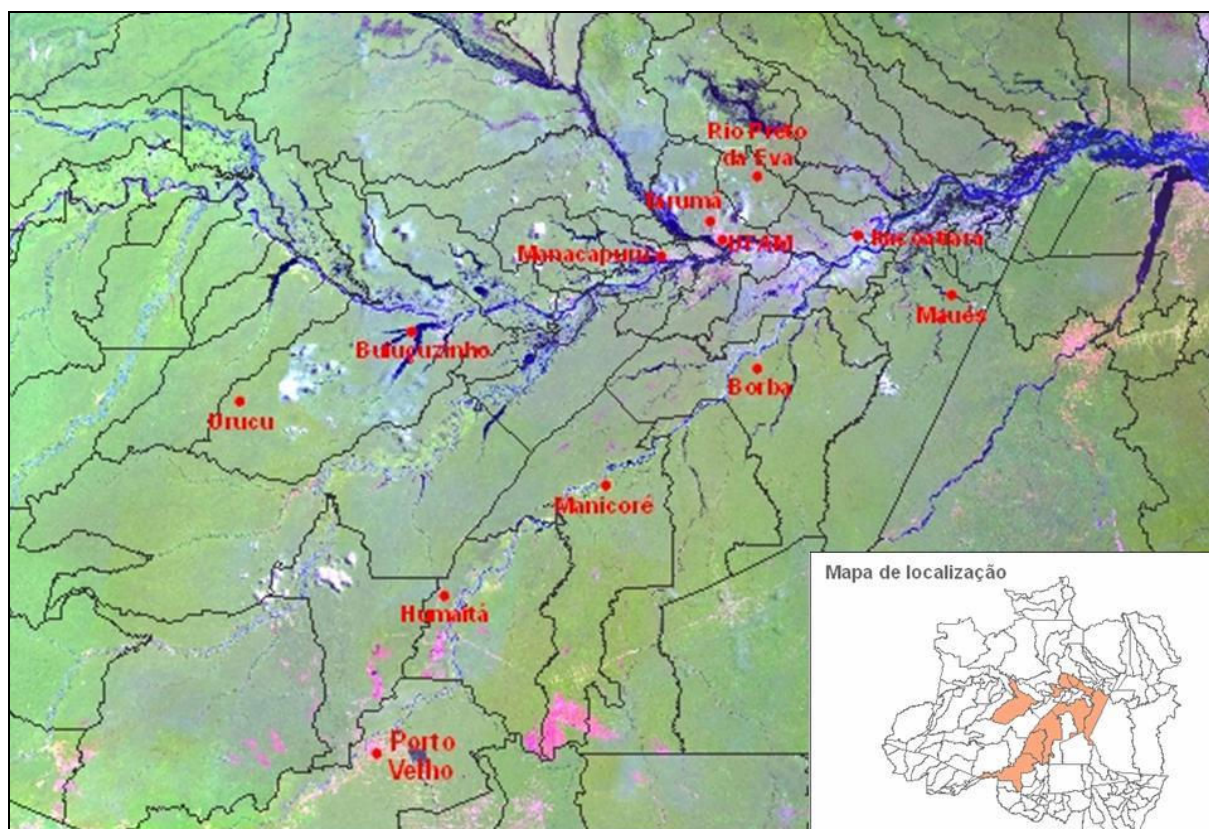


Figura 1: Mapa com a localização das populações onde as amostras de folhas de tucumanzeiro (*Astrocaryum aculeatum*) foram coletadas. Fonte: SIVAM. Elaboração: Eliene Cruz

As populações mais próximas são UFAM e Tarumã separadas por aproximadamente 27 quilômetros, as mais distantes são Urucu e Maués separadas por 830 quilômetros.

Nas expedições foram coletadas amostras das folhas, preferencialmente jovens e saudáveis. Estas folhas foram acondicionadas em sacos plásticos contendo sílica gel e levadas para o laboratório onde foram submetidas à extração de DNA e análise com marcadores SSR.

As plantas objeto do estudo foram devidamente marcadas e sua posição geográfica registrada usando o Sistema de Posicionamento Global (GPS).

2.2 Extração do DNA

Foram testados dois diferentes protocolos de extração do DNA genômico a partir das amostras de folhas de tucumanzeiro. O primeiro testado foi utilizando o reagente de DNAzol (Invitrogen) e o segundo utilizou o detergente catiônico CTAB 2% (*Cationic Hexadecyltrimethyl Ammonium Bromide*) descrito por Doyle e Doyle (1987), seguindo-se o protocolo otimizado por Ferreira e Grattapaglia (1998).

Após os testes o método que apresentou DNAs em melhores condições foi utilizado para extração de todas as amostras.

2.3. 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* nas concentrações de 50, 100 e 200 ng/μL. 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 foto documentação (Geldoc - Bio Rad).

2.4. Amplificação dos Locos Microssatélites

O polimorfismo dos marcadores microssatélites foi revelado pela PCR , utilizando-se dois *primers* ou iniciadores únicos, que flanqueiam e amplificam o *locus* de interesse. Para as análises genéticas foram amplificados 4 *loci* microssatélites desenvolvidos para *Bactris gasipaes* (Billotte *et al.* 2004; Martinez *et al.* 2002) e transferidos com sucesso para *A. aculeatum* no Laboratório de Genética Vegetal (LGV) na Universidade Federal do Amazonas (UFAM) sob orientação da Dra. Doriane Picanço Rodrigues (em fase de elaboração). Os marcadores foram marcados na extremidade 5' com um dos seguintes fluorocromos: 6-carboxifluorosceína (Fam), ou hexacloro-6-carboxifluorosceína (Hex), como podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1: Características de 4 *loci* microssatélites transferidos com sucesso para tucumã e utilizados na realização deste trabalho.

<i>Primer</i>	<i>Seqüência do primer (5' → 3')</i>	<i>Repetição (SSR)</i>	<i>Fluorescência</i>	<i>Referência</i>
mBg41	F: TGGAGGTTTCAAGATAGAC R: AGTGTGGCGATCTGTC	(GA) ₁₆	Fam	Billotte <i>et al.</i> 2004
mBg66	F: GCATGTTGCATTGACTA R: GAATCCTGGTTCAGATACT	(GA) ₁₉	Hex	Billotte <i>et al.</i> 2004
mBg91	F: CAAGAACAGGCTCAGTCTA R: TGCAATCAACCCAAGAT	(GA) ₁₆	Fam	Billotte <i>et al.</i> 2004
Bgl1	F: AGAGGAGGAAAGCAAGCGT R: CGACCATTTCAGTTCCATCATC	(CT) ₁₆	Fam	Martinez <i>et al.</i> 2002

Para a reação de amplificação foram utilizados 10 µL de uma mistura inicial contendo 1 µL de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,4), 1 µL de dNTP (2,5 µM); 1 µL MgCl₂ (25 mM); 0,5 µL de *primer forward* M13 (5 µM), 0,5 µL de *primer forward* M13 marcado com FAM ou HEX (5 µM), 1 µL de *primer reverse* (5 µM); 1 U de Taq DNA polimerase (Biotools), 40 ng de DNA e água ultrapurificada para completar o volume. A PCR procedeu-se em termociclador MJ PTC-100 nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, desnaturação a 94 °C por 10 segundos, anelamento dos *primers* a TA (temperatura de anelamento específica de cada *primer*) por 20 segundos, extensão: 72 °C por 30 segundos, repetição das etapas anteriores por mais 25 vezes para amplificação da região do *primer*. extensão a 72 °C por 10 minutos, segunda desnaturação a 94 °C por 10 segundos, anelamento do *primer* M13 a 50 °C por 20 segundos, extensão a 72 °C por 30 segundos, repetição apartir da segunda desnaturação por mais 20 vezes para amplificação e incorporação da fluorescência, extensão final a 72 °C por 30 minutos.

Os produtos de PCR gerados foram visualizados em seqüenciador automático de DNA (Mega Bace 1000). A estimativa do tamanho dos alelos (pb - pares de base) foi realizada com os programas Fragment Profiler (GE Helathcare, England), auxiliado pelo marcador de peso molecular (*Size Standard*) ET – 400 – ROX (GE Helathcare, England).

2.5 Análise genética dos Dados

Foram calculadas as freqüências alélicas para cada *locus* com auxílio do programa CONVERT (GLAUBITZ, 2004). O número de alelos (*A*), a heterozigosidade observada (*Ho*) e esperada (*He*), foram calculados para cada *locus* e população com o programa Arlequin v.3.0 (EXCOFFIER e SCHNEIDER, 2005). O número de alelos privados (*P* – definido como um alelo encontrado em uma única população) foi calculado usando o programa CONVERT

(GLAUBITZ, 2004). Os alelos foram classificados como comum (frequência $> 0,2$), intermediário ($> 0,05$) ou raro ($< 0,05$), bem como privado (presente em apenas uma população), esporádico (presentes de duas a cinco populações) ou difundido (presente em mais de cinco populações), similar ao esquema de Marshall e Brown (1975).

O programa Arlequin v.3.0 (EXCOFFIER e SCHNEIDER, 2005) também foi utilizado para testar o desequilíbrio de ligação entre pares de *loci* e o teste exato para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para as amostras populacionais.

Para determinar a estrutura genética entre e dentro das populações, uma análise hierárquica da variância molecular (AMOVA, MICHALAKIS e EXCOFFIER, 1996) foi efetuada, usando o programa Arlequin v.3.0 (EXCOFFIER e SCHNEIDER, 2005). O grau de diferenciação das populações foi quantificado pela estimativa de F_{ST} entre os pares com auxílio do Programa Arlequin v.3.01.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

3.1 Extração de DNA

No primeiro protocolo de extração de DNA utilizou-se o reagente DNazol (Invitrogen), reagente este já utilizado pra extração de DNA de outras palmeiras apresentando bons resultados. No entanto, não foi satisfatório para tucumã; o DNA apresentava-se degradado e em pouca quantidade.

No segundo método utilizou-se o detergente catiônico CTAB 2% e apresentou ótimos resultados. A quantidade de DNA obtida é suficiente para realização dos trabalhos, e é de boa qualidade, como se pode observar na figura abaixo.

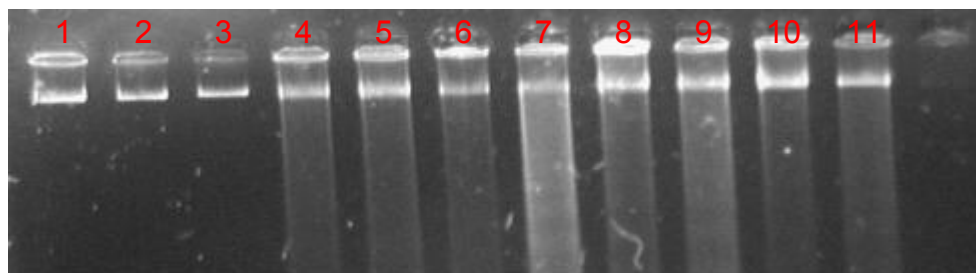


Figura 02: Visualização da quantificação das amostras de DNA de 8 indivíduos de *Astrocaryum aculetaum* em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (colunas de 4 a 11). As colunas de 1 a 3 indicam, respectivamente os marcadores de peso molecular 50, 100 e 200 ng.

3.2 Diversidade alélica dos *loci* microssatélites

Os quatro *loci* microssatélites detectaram 48 alelos nas doze populações, com uma média de 12 alelos por *locus*, confirmando o alto conteúdo de informação genética deste tipo de marcador para estudos genéticos em palmeiras. O número de alelos por *locus* variou de 8 (mBg41) a 15 (mBg62). A distribuição das frequências alélicas variou entre os *loci* e as populações.

Os alelos foram classificados de acordo com suas frequências e distribuição entre as populações (Tabela 2 e Figura 3). Um total de 30 alelos foi classificado como raros, a maioria deles presente em pelo menos duas populações. As populações de Manacapuru e Tarumã apresentaram três alelos privados cada uma, num total de 13 alelos privativos de populações

específicas. Cole *et al.* (2007) encontraram seis alelos raros privativos em quatro populações de pupunheira cultivadas por comunidades indígenas e camponesas, mesmo utilizando três *loci* microssatélites, o que sugere que alelos privativos são freqüentes, como esperado pelas altas taxas de mutação. Para populações que apresentaram alelos raros ou privados, faz-se necessário a coleta de um maior numero de indivíduos quando na criação de Bancos de Germoplasma e Programas de Melhoramento, isso aumentara a freqüência desses alelos.

Tabela 2: Classificação do número de alelos de acordo com sua freqüência e distribuição entre amostras de Tucumã (*Astrocaryum tucuma*) de dose populações considerando quatro microssatélites.

	Comum (> 0,2)	Intermediário (> 0,05 e < 0,2)	Raro (< 0,05)	Total
Privados	0	0	13	13
Esporádicos	0	0	16	16
Difundido	6	12	01	19
Total	6	12	30	48

As estimativas de diversidade total foram altas para todos os loci estudados (Tabela 3), sendo similares às encontradas para outras palmeiras como *Bactris gasipaes* (COLE *et al.*, 2007; HERNANDEZ, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2004), *Cocos nucifera* (PERERA *et al.* 2000), *Elaeis guineensis* e *E. Oleifera* (BILLOTTE *et al.*, 2001), *Euterpe edulis* (GAIOTTO *et al.*, 2001), *Oenocarpus bacaba* (LEPSCH-CUNHA, 2003), *Phoenix dactylifera* (ZEHDI *et al.*, 2004).

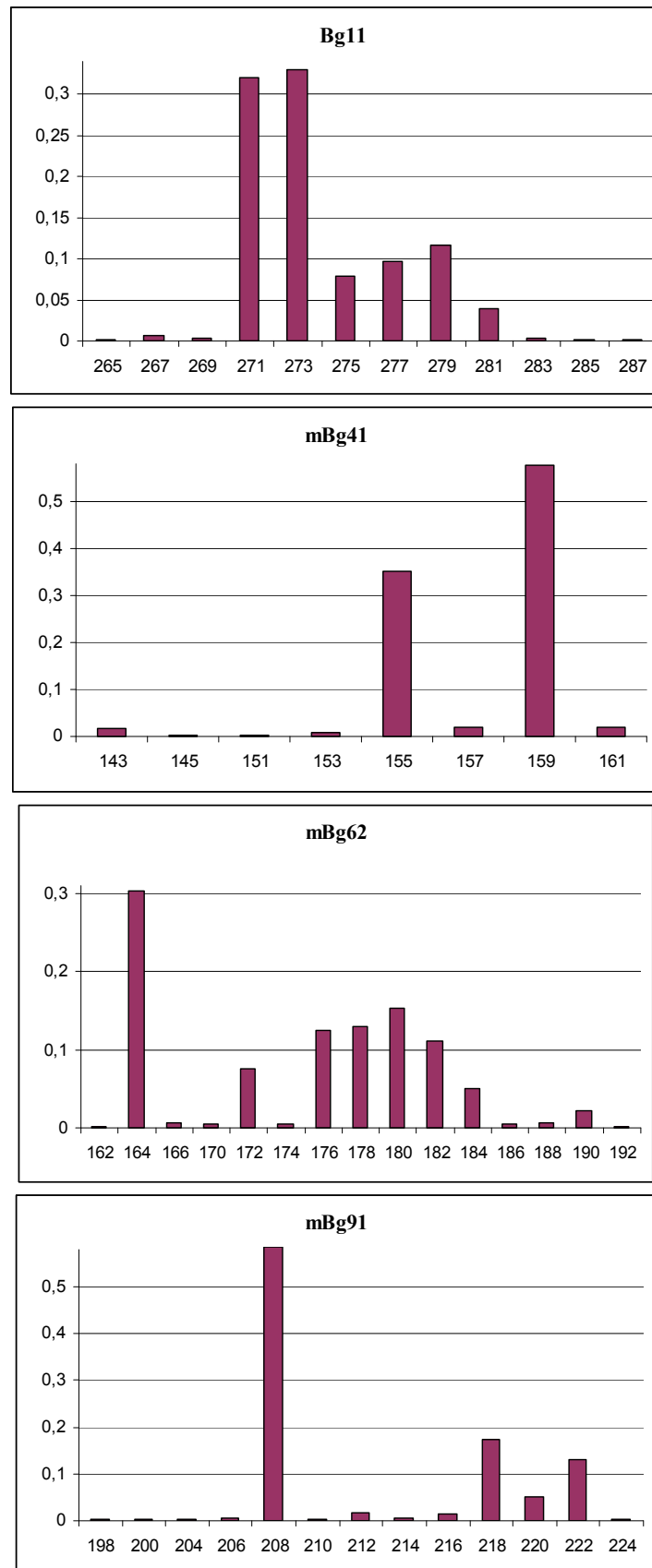


Figura 3: Histograma de distribuição das frequências alélicas de quatro loci microssatélites nas populações de tucumaneiro (*Astrocaryum aculeatum*).

As estimativas de heterozigosidade observadas (H_o) e esperadas (H_e) totais, quando consideramos todas as amostras como sendo de uma única população foram altas para todos os *loci* (Tabela 3), sendo similares às estimativas reportadas para outras palmeiras, cultivadas ou não.

Tabela 3: Índice de diversidade genética para os quatro *loci* do conjunto,. A – Número de alelos; H_o – Heterozigosidade observada; H_e – Heterozigosidade esperada; H_e^* não significativo a $p > 0,05$.

População		Bg11	mBg41	mBg62	mBg91	Total
Tucumã	A	12	8	15	13	24
(N=358)	H_o	0,67	0,43	0,72	0,60	0,59
	H_e	0,76	0,54	0,83	0,61	0,60

As estimativas das heterozigosidades observadas (H_o) e esperadas (H_e) para cada uma das populações foram altas na maioria dos *loci*, com valores menores em mBg41 (Tabela 4). No *loci* Bg11 os valores de H_o foram maiores que os valores encontrados para H_e , em quase todas as populações.

Os *loci* foram analisados individualmente para cada população e 70% não aderiram ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Zehdi *et al.* (2004) demonstraram, usando 14 *loci* microsatélites, deficiência significativa de heterozigotos para dois grupos de populações de tâmara (*Phoenix dactylifera* L.) na Tunísia e nenhum desvio ao EHW em outros dois grupos, e sugerem que isto poderá ser explicado pela forte seleção operada nestes dois grupos em relação aos outros. Rodrigues (2007) apresentou 50% dos oito *loci* sem aderência para pupunheira e sugeriu que esta não seja devido à amostragem ser viciada pela seleção durante a prospecção para criar o ensaio de progênies e pela seleção no ensaio para amostrar plantas com maior comprimento do palmito, eliminando a casualidade da amostragem.

Em nosso estudo é possível que as amostras estudadas não fossem representativas da população. As populações de Humaitá, Borba, Itacoatira e Rio Preto da Eva não aderiram ao equilíbrio de Hardy-Weinberg em nenhum *loci* estudado, a justificativa para não aderência pode ser devido à população de Humaitá ser grande e provavelmente não foi bem representada na amostragem. As populações de Borba e Rio Preto da Eva são manejadas e podem ter sofrido seleção antrópica. A população de Itacoatiara é uma população em idade ainda não reprodutiva que germinou em área de cultivo e degradada pela cultura e provavelmente sofreu seleção natural durante o processo de limpeza e queimada na área para o plantio da cultura.

Tabela 4: Índices de diversidade genética, de quatro *loci* microssatélites para amostras de tucumanzeiro (*Astrocaryum aculeatum*) de doze populações. *A* – Número de alelos; *P* – Número de Alelos Privados; *H_o* – Heterozigosidade observada; *H_e* – Heterozigosidade esperada * Equilíbrio de Hardy Weinberg não significativo a $p > 0,05$.

População		Bg11	mBg41	mBg62	mBg91	Total
Porto Velho (N=30)	<i>A</i>	6	3	8	7	24
	<i>P</i>	1	—	—	—	1
	<i>H_o</i>	0,74	0,36	0,71	0,58	0,59
	<i>He</i>	0,73	0,46	0,73*	0,48*	0,60
Humaitá (N=30)	<i>A</i>	5	2	8	7	22
	<i>P</i>	—	—	—	—	—
	<i>H_o</i>	0,50	0,55	0,72	0,52	0,57
	<i>He</i>	0,42*	0,48*	0,70*	0,60*	0,55
Manicoré (N=30)	<i>A</i>	5	3	6	4	18
	<i>P</i>	1	—	—	—	—
	<i>H_o</i>	0,83	0,30	0,73	0,40	0,57
	<i>He</i>	0,56	0,52	0,75*	0,35*	0,55
Borba (N=30)	<i>A</i>	4	3	10	4	17
	<i>P</i>	—	—	—	—	—
	<i>H_o</i>	0,65	0,62	0,70	0,42	0,60
	<i>He</i>	0,49*	0,60*	0,65*	0,52*	0,57
Urucu (N=30)	<i>A</i>	4	4	5	3	16
	<i>P</i>	—	—	1	—	1
	<i>H_o</i>	0,96	0,50	0,53	0,57	0,64
	<i>He</i>	0,54	0,57*	0,75	0,59*	0,61
Buiçuzinho (N=30)	<i>A</i>	4	4	6	4	18
	<i>P</i>	—	—	—	—	—
	<i>H_o</i>	0,90	0,56	0,67	0,53	0,67
	<i>He</i>	0,64	0,53*	0,71*	0,51*	0,60
Manacapuru (N=30)	<i>A</i>	4	6	6	4	20
	<i>P</i>	—	2	1	—	3
	<i>H_o</i>	0,69	0,41	0,76	0,72	0,65
	<i>He</i>	0,59*	0,71	0,71*	0,73*	0,69
Itacoatiara (N=30)	<i>A</i>	6	2	7	6	21
	<i>P</i>	—	—	—	—	—
	<i>H_o</i>	0,52	0,48	0,90	0,65	0,60
	<i>He</i>	0,48*	0,43*	0,74*	0,66*	0,58
Rio Preto da Eva (N=30)	<i>A</i>	6	2	6	4	18
	<i>P</i>	—	—	—	1	1
	<i>H_o</i>	0,95	0,11	0,69	0,54	0,57
	<i>He</i>	0,71*	0,14*	0,77*	0,45*	0,52
Maués (N=30)	<i>A</i>	8	4	8	5	25
	<i>P</i>	2	—	—	—	2
	<i>H_o</i>	0,62	0,52	0,52	0,88	0,64
	<i>He</i>	0,80*	0,71	0,75	0,79	0,76
UFAM (N=30)	<i>A</i>	3	2	6	7	18
	<i>P</i>	—	—	—	1	1
	<i>H_o</i>	0,47	0,38	0,77	0,79	0,60
	<i>He</i>	0,41*	0,34*	0,83*	0,67*	0,56*
Tarumã (N=30)	<i>A</i>	5	3	7	5	20
	<i>P</i>	1	—	1	1	3
	<i>H_o</i>	0,23	0,40	0,87	0,67	0,54
	<i>He</i>	0,62	0,47*	0,68	0,55	0,58

3.3 Diversidade Genética entre e dentro das populações

O número de alelos variou entre os *loci* e as populações, não podendo separá-las em grupos com maior ou menor número de alelos por *loci*.

Os altos índices de diversidade nas populações foram similares aos encontrados para outras palmeiras como *Bactris gasipaes* (COLE *et al.*, 2007; HERNANDEZ, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2004), *Cocos nucifera* (PERERA *et al.* 2000), *Elaeis guineensis* e *E. Oleifera* (BILLOTTE *et al.*, 2001), *Euterpe edulis* (GAIOTTO *et al.*, 2001), *Oenocarpus bacaba* (LEPSCH-CUNHA, 2003), *Phoenix dactylofera* (ZEHDİ *et al.*, 2004), utilizando marcadores microssatélites.

A análise da variância molecular (AMOVA) revelou maior variabilidade genética dentro das populações (intrapopulacional), e uma variabilidade menor entre as populações (interpopulacional), resultado que corroboram com afirmações de autores como Hamrick (1983) Hamrick e Godt (1990); Kageyama e Gandara (1993); Kageyama *et al.* (2003), que afirmam que em plantas tropicais a distribuição da variabilidade é maior dentro das populações que entre populações. O *loci* Bg11 apresentou a menor variabilidade intrapopulacional (72,50%), mas ainda assim é maior que a encontrada entre as populações (Tabela 5). Resultados similares foram observados por Perera *et al.* (2001) para populações de coco do Sri Lanka, o qual demonstrou 98,5% de variação dentro das populações e por Rodrigues (2007) com pupunha que encontrou 83,7% de variação dentro das progênies.

Tabela 5: Valores em porcentagem das variabilidades intrapopulacional e interpopulacional, e diferenciação genética (*FST*) das doze populações de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) para cada um dos *loci* microssatélites.

	Bg11	mBg41	mBg62	mBg91
Variabilidade Interpopulacional	27,50	13,26	13,74	7,94
Variabilidade Intrapopulacional	72,50	86,74	86,26	92,06
<i>FST</i>	0,27492	0,1326	0,13741	0,0794

A diferenciação genética (*FST*) entre as populações foi alta ($FST > 0,05$). A maior diferenciação genética foi encontrada entre as populações de Rio Preto da Eva e Urucu (Tabela 6), que são também as mais distantes geograficamente, separadas por aproximadamente 650 km; e a menor foi entre as populações de Buiuçuzinho e Urucu (Tabela 6), ambas no município de Coari e com conexão através do Rio Urucu, provável canal de

fluxo gênico. No entanto as outras populações não apresentam padrões de diferenciação genética que possam inferir que a distância geográfica esteja interferindo nessa diferenciação.

Tabela 6 - Matriz de divergência (F_{ST}) entre amostras de tucuma (*Astrocaryum aculeatum*) de doze populações (Pop: 1. Porto Velho, 2. Humaitá, 3. Manicoré, 4. Borba, 5. Urucu, 6. Buiuçuzinho, 7. Manacapuru, 8. Itacoatiara, 9, Rio Preto da Eva, 10. Maués, 11. UFAM, 12 Tarumã) considerando quatro *loci* microsatélites; valores de $F_{ST}p < 0,05$.

Pop	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.0000											
2	0.11201	0.0000										
3	0.14492	0.05075	0.0000									
4	0.17233	0.08001	0.08691	0.0000								
5	0.10779	0.23372	0.20826	0.22802	0.0000							
6	0.09076	0.21393	0.17233	0.23453	0.04200	0.0000						
7	0.08004	0.21557	0.19917	0.21957	0.10944	0.08713	0.0000					
8	0.16543	0.09807	0.15487	0.11120	0.26298	0.25068	0.18573	0.0000				
9	0.13230	0.11051	0.18149	0.17354	0.30169	0.28574	0.22093	0.09577	0.0000			
10	0.12780	0.09418	0.15829	0.12885	0.20043	0.19783	0.16455	0.07451	0.15814	0.0000		
11	0.07300	0.25013	0.27579	0.26504	0.19704	0.18405	0.05593	0.20936	0.20171	0.22821	0.0000	
12	0.04596	0.11374	0.14457	0.16452	0.17546	0.16712	0.07414	0.12221	0.13856	0.15233	0.06469	0.000

4. CONCLUSÕES

Os quatro *loci* microssatélites utilizados neste estudo foram extremamente informativos, com altas heterozigisidades (esperada e observada) e número de alelos. Os índices de diversidade foram elevados para todas as populações.

A análise da estrutura genética populacional demonstra uma alta diferenciação entre as populações, no entanto as populações não apresentam padrões de diferenciação genética que possam inferir que a distância geográfica esteja interferindo nessa diferenciação. Esta variabilidade pode ser utilizada no programa de melhoramento, se associada a características morfo-métricas, estudo este ainda não realizado nas populações estudadas.

O questionamento agora é como orientar a seleção de matrizes, incluindo qual o número mínimo de indivíduos por população, para compor o banco de germoplasma. Esta seleção também deverá ser orientada a partir do conhecimento do sistema de cruzamento da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRICH, P.R.; HAMRICK, J.L.; CHAVARRIAGA, P. & KOCHERT, G. 1998. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. **Molecular Ecology**, 7: 933-944.
- ALI, M.; COPELAND, L.O.; ELIAS, S.G.; KELLY, J.D. 1995. Relationship between genetic distance and heterosis for yield and morphological traits in winter canola (*Brassica napus* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, n. 1, p. 118-121.
- AZEVEDO, V.C.R., VINSON C.C., CIAMPI A.Y. 2005. Twelve microsatellite loci in *Manilkara huberi* (Ducke) Standl (Sapotaceae), an Amazonian timber species. **Molecular Ecology Notes**, 5:13-15.
- BACELAR-LIMA, C.G.; COLETTI-SILVA, A.; GRIBEL, R. 2003. Biologia floral e visitantes de *Astrocaryum aculeatum* Meyer (Arecaceae) em Manaus, AM, Brasil. In: **Congresso Brasileiro de Botânica**, 54, Anais, SBB, Belém. (CD-ROM).
- BACELAR, C.G.; PESSONI, L. A. 2000. Estrutura populacional do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) na Estação Ecológica de Maracá, RR. In: **Congresso Brasileiro de Sistemas Agroflorestais**, 3, Anais, Manaus, AM. 180-182.
- BARBOSA NETO, J.F.; HERNÁNDEZ, C.M.; O'DONOUGHUE, L.S.; SORRELIS, M.E. 1997. Precision of genetic relationship estimates based on molecular markers. **Euphytica**, Netherlands, v. 98, n. 1-2, p. 59-67.
- BERNARDES, L.G., LEMES, M.R., QUEIROZ, E.J.S., SHEPPARD, G., SILVA, M.N.F., QUEIROZ, A.L. GRIBEL, R. 2003. Filogeografia da castanheira da Amazônia (*Bertholletia excelsa*): evidências da ação humana na dispersão da espécie com base na análise do genoma do cloroplasto. **Resumos do 49º Congresso Nacional de Genética**. pg. 673.
- BILLOTE, N.; RISTERUCCI, A.M.; BARCELOS, E.; NOYER, J.L.; AMBLARD, P.; BAURENS, F.C. 2001. Development, characterization, and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) microsatellite markers. **Genome**, v. 44, n. 3, p. 413-425.
- BILLOTTE, N.; COUVREUR, T.; MARSEILLAC, N.; BROTTIRR, P.; PERTHUIS, B.; VALEJO, M.; NOYER, J.L.; JACQUEMOUD-COLLET, J.P.; RISTERUCCI, A.M.; PINTAUD, J.C. 2004. A new set of microsatellite markers for the peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth); characterization and across-taxa utility within the tribe Cocoeae. **Molecular Ecology** 4: 580-582.
- BONDAR, G. 1964. Palmeiras do Brasil. Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica. Boletim nº 2. pg 159.
- BRANCO, C.C. de C., DOMINGUES, J.B. 1997. Estudo Bromatológico da amêndoa do tucum. **Revista Farmácia Bioquímica**. 1. Univ. S. Paulo. 15 (1/12). 109-130 Jan-Dez.
- BRONDANI, R.P.V.; GAIOTTO, F.A.; MISSIAGGIA, A.A.; KIRST, M.; GRIBEL, R.; & GRATTAPAGLIA, D. 2003. Microsatellite markers for *Ceiba pentandra* (Bombacaceae), an endangered tree species of the Amazon forest. **Molecular Ecology Notes**, 3: 177-179.

- BRONDANI, R.P.V., BRONDANI, C., TARCHINI, R., GRATTAPAGLIA, D. 1998. Development, characterisation and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. Urophylla*. Their Appl. **Genetic** 97: 816-827.
- CARON, H., DUMAS, S., MARQUE, G., MESSIER, C., BANDO, E., PETIT, R.J., KREMER, A. 2000. Spatial and temporal distribution of chloroplast DNA polymorphism in a tropical tree species. **Molecular Ecology** 9: 1089-1098.
- CAVALCANTE, P.B., 1991. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Museu Paraense Emilio Goeldi. Edições CEJUP. CNPq. Belém.
- CAVERS, S.; NAVARRO, C., LOWE, J. 2003. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a Neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. **Molecular Ecology** 12: 1451-1460.
- CHASE, M., KESSELI, R.; BAWA, K. 1996. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. *American Journal of Botany*, 83 (1):51-57.
- CHAVES, J.M., PECHNIK, E. 1947 Tucumã. **Revista de Química Industrial**. Rio de Janeiro, v.16, n. 184.
- CIAMPI, A.Y.; BRONDANI, R.P.V.; & GRATTAPAGLIA, D. 2000. **Otimização de sistemas fluorescentes de genotipagem multiloco e desenvolvimento de marcadores microsatélites para *Copaifera langsdorffii* Desf. (Copaíba) – Leguminosae – Caesalpinioideae**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 40p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa, 16).
- CLEMENT, C.R.; CLAY, J.W.; SAMPAIO, P.T.B. 1999. **Biodiversidade amazônica: exemplos e estratégias de utilização**. 1ª ed. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico, 409p.
- CLEMENT, C.R.; LLERAS, E.; van LEEUWEN, J. 2005. O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. **Agrociências**, Montevideo, 9 (1-2): 67-71.
- COCKERHAM, C.C. 1969. Variance of gene frequency. **Evolution**, v.23, p.72-84.
- COLE, D.M.; WHITE, T.L.; NAIR, P.K.R. 2007. Maintaining genetic resources of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth): The role of seed migration and swidden-fallow management in northeastern Peru. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.54, n.1, p.189-204.
- COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.V. & GRATTAPAGLIA, D. 1999. **Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense***. *Heredity*, 83: 748-756.
- CORADIN, L. 1990. **Palmeiras nativas: da poesia para a economia**. In: Informativo do Centro de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEM/EMBRAPA. nº5. Agosto.

COSTA, J.R. 2001. O tucumã (*Astrocaryum aculeatum* G.F.W. Meyer): uma espécie de potencial agroflorestal para a terra firme do estado do Amazonas-Brasil. **III Congresso Brasileiro de Sistemas Agroflorestais**. Manaus, Amazonas, p.232-234.

COSTA, J.R.; VAN LEEUWEN, J. 2002. O uso do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) por produtores rurais em áreas alteradas e degradadas no Estado do Amazonas. **V Simpósio Nacional sobre Recuperação de Áreas Degradadas**. Belo Horizonte, Minas Gerais, p 311-312.

CRUZ, P.E.N., MARQUES, E.P., AMAYA, D.R. 1984. .Macaúba, bacuri, ingá e tucumã. Caracterização química e nutricional destes frutos do Estado do Maranhão e os óleos respectivos. **Revista Química Industrial**, Maranhão. N. 278.

DAYANANDAN, S., BAWA, K.S., KESSELI, R. 1997. Conservation of microsatellites among tropical trees (Leguminosae). **American Journal Botanic** 84:1658

DEMASURE, D.; SODZI, N.; PETIT, R.J. 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions mitochondrial and chloroplast DNA in plants. **Molecular Ecology** 4:129-131.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J. L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12: 13-15.

DUMOLING-LAPEGUE, S; DEMASURE, B., FINESCHI, S. Le CORRE, V.; PETIT, R.J.. 1997. Phylogeographic Structure of White Oaks Throughout the European Continent. **Genetics** 146: 1475-1487.

DUTECH, C., MAGGIA, L., JOLY, H.I. 2000. Chloroplast diversity in Vouacapoua americana (Caesalpinaceae), a neotropical forest tree. **Molecular Ecology** 9:1427-1432.

EL MOUSADIK, A. e PETIT, R.J. 1996. Chloroplast phylogeography of the argan of the tree of Marrocco. **Molecular Ecology** 5: 547-555

EPALMETUM. Classificação. Disponível: site epalmetum (2003 – 2006). Disponível em: <http://www.epalmetum.com> Acesso em: 14 de julho de 2006.

EXCOFFIER, L.G.L.; SCHNEIDER, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p.47-50.

FAO. 1987. **Especies forestales productoras de frutas y otros alimentos**. 3. Ejemplos de America Latina. 44(3). Rome, Italia. 241p.

FARIA, C. P; LEMES, M. R; GRIBEL, R. 2001. Transferibilidade de marcadores de DNA microsatélites entre espécies do gênero *Theobroma* (Sterculiaceae). **Anais da X Jornada de Iniciação Científica PIBIC/CNPq/INPA 04 a 06 de julho de 2001**.

FEDEPALMA. 2006. **Oil Palm Production Area in the World**. Disponível em: <<http://www.fedepalma.org/statistics.shtm>>. Acesso em 28 de março de 2006.

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

GAIOTTO, F. A.; BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. 2001. Microsatellite for heart of palm – *Euterpe edulis* and *Euterpe oleraceae* Mart. (Arecaceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 35, p. 294-301.

GENTIL, D.F.O.; FERREIRA, S.A.N. 2002. Morfologia da germinação de sementes de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer - Arecaceae). **In: Congresso Brasileiro de Fruticultura**, 17, Belém. (CD-ROM).

GLAUBITZ, J. C.; MORAN, G. F. 2000. Genetic Tools: The use of biochemical and molecular markers. **In: Forest Conservation Genetics – Principles and Practice**.

GRATTAPAGLIA, D. 1999. Molecular markers for forest trees: where are we going? **In: BORÉM, A.; GIÚDICE, M.P.; SAKIYAMA, N.S. (Eds.). Plant breeding in the turn of themillennium**. Viçosa:Univ. Viçosa. p. 79-101.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.M. 1990. Allozyme diversity in plant species. **In: Brown, KAHN, F., MOUSSA, F. . Palmeiras da Amazônia**. Contact. São Paulo: Centrotec. 1994. v.6 p.11-16. A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L. (Ed.) **Plant population genetics, breeding, and genetic resources**. Sunderland: Sinauer Associates, 145-162.

HAMRICK, J.L. 1983. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. **In: Genetic and Conservation: a reference for managing wild animal and plant populations**. Schonewald-Cox, C.M., Chambers, S.M., MacBryde, B. (Ed.) Menlo Park: Benjamin Cummings Publ., 335-348.

HENDERSON, A.; SCARIOT, A. 1993. A Flora da Reserva Ducke, I: Palmae (Arecaceae). **Acta Amazonica**. Manaus, v.23 n.4.

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B. 1993. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: implicações para manejo e a conservação. **In: Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira**, 3, Serra Negra. Anais. São Paulo: Academia de Ciências do Estado de São Paulo, p.1-4.

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

KAHN, F., MOUSSA, F. 1994. **Palmeiras da Amazônia**. Contact. São Paulo: Centrotec. v.6 p.11-16.

KAHN, F.; MILLÁN, B. 1992. *Astrocaryum* (Palmae) in Amazonia: a preliminary treatment. **Bulletin de l'Institut Français**, 21(2):459-531.

KING, R. A.; FERRIS, C. 1998. Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. **Molecular Ecology** 7: 1151-1163.

- LAVIN, M., MATHEWS, S., HUGHES, C. 1991. Chloroplast DNA variation in *Gliricidia sepium* (Leguminosae): intraspecific phylogeny and tokogeny. **American Journal of Botany** 78: 1576-1585.
- LEMES, M. R. BRONDANI, R. P. V.; & GRATTAPAGLIA, D. 2002. Multiplexed system of microsatellite markers for genetic analysis in mahogany, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), a threatened netropical timber species. **Journal of Heredity**, 93: 287-290.
- LEPSCH-CUNHA, N.; LUND, C. A.; HAMILTON, M. B. 2003. Isolation and characterization of nuclear microsatellite loci in the tropical arboreal palm *Oenocarpus bacaba* (Arecaceae). **Molecular Ecology Notes** v. 3, p. 435-437.
- LIMA, R.R.; TRASSATO, L.C.; COELHO, V. **O tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.): principais características e potencialidades agroindustrial**. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1986. 25p.(EMBRAPA-CPATU. Boletim de Pesquisa, 75).
- LIVINI, C.; AJMONE MARSAN, P.; MELCHINGER, A.E.; MESSMER, M.M.; MOTTO, M. 1992. Genetic diversity of maize inbred lines within and among heterotic groups revealed by RFLP. *Theoretical Applied Genetics*, v.84, p.17-25.
- LITT, M. e LUTY, J. A. 1989. **A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene.** *Am. J. Hum. Genet.*, 44: 398-401.
- LLERAS, E.; GIACOMETTI, D. C. e CORADIN, L. 1983. Áreas críticas de distribución de palmas en las Americas para colecta, evaluación y conservación. Pp. 67-101. In: **Informe de la reunión de consulta sobre palmeras poco utilizadas de America Tropical**. FAO, Turrialba.
- LORENZI, H.; SOUZA, A. M.; MEDEIRAS-COSTA, J. T.; CERQUEIRA, L. S. C.; von BEHR, N. 1996. **Palmeiras do Brasil: Exóticas e Nativas**. Plantarum, Nova Odessa.
- MARTÍNEZ, A.K.; GAITÁN-SOLIS, E.; DUQUE, M.C.; BERNAL, R.; TOHME, J. 2002. Microsatellite loci in *Bactris gasipaes* (Arecaceae): their isolation and characterization. **Molecular Ecology** 2:408-410.
- MARTINS, R.L. 2002. **Polinização, Sistema de Cruzamento e Fluxo Gênico em *Caryocar villosum* (Aubl.) Pers. (Caryocaraceae), uma Árvore Emergente da Floresta Amazônica**. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-graduação em Ecologia, Inpa/Ufam. 63p.
- MENDONÇA, M. S. 1996. **Aspectos morfológicos das sementes de algumas espécies de palmeiras (Arecaceae = Palmae) da Amazônia**. Tese (Concurso de Professor Titular), Universidade do Amazonas, Manaus. 68p.
- MICHALAKIS, Y.; EXCOFFIER, L. 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. **Genetics**, v. 142, p. 1061-1064.
- MILACH, S. 1998. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Sandra Milach, 141p.

MORGANTE, M.; OLIVIERE, A. M. 1993. PCR-Amplified microsatellites as markers in plant genetics. **Plant Journal**, 3: 175-182.

MOUSSA, F., KAHN, F. 1997. Y potencial econômico de dos palmas, *A. aculeatum* Meyer e *A. vulgare* Martius, em la Amazônia. In: **Usos y recursos vegetales em el Ecuador**. Montserrat Rios y H. Borgtoft pedersen. (Eds), Quito.

MOUSSA, F.; KAHN, F. 1996. A importância econômica do tucumazeiro de Manaus, *Astrocaryum aculeatum*. In: **Simpósio internacional sobre ecossistemas florestais**, 4, Anais, Belo horizonte. p. 72.

MULLIS, K.B. 1983. The unusual origin of the polymerase chain reaction, *Sci. Am.* (1983), pp. 56–65.

NEI, M. 1987. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Columbia University Press, 512 p.

NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academic of Sciences**, v.70, p.3321-3323.

NEI, M. 1997. F-statistic of gene diversity in subdivided populations. **Annals of Humam Genetics**, v.41, p.225-330.

OIL WORLD.2005. **Oil World Annual**. Hamburg: ISTA Mielke.

OLSE,K.M.; SCHAAL,B.A. 1999. Evidence on the origin of cassava: Phylogographic of *Manihot esculenta*. **Evolution** 96: 5586-5591.

PERERA, L.; RUSSEL, J.R.; PROVAN, J.; McNICOL, J.W.; POWELL,W. 1999. Identification and characterization of microsatellites in coconut (*Cocus nicifera* L.) and the analysis of coconut populations in Siri Lanka. **Molecular Ecology** 8: 344-346.

PRANCE, G. T. 1987. **Botânica Econômica de algumas espécies amazônicas**. Manaus-AM.

QUEIROZ, M.H. 1986. Botão germinativo do palmito como indicador da germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, 2: 55-59.

RAFALSKI, J. A., MORGANTE, M., POWELL, W., VOGEL, J. M. e TINGEY, S. V. 1996. **Generating and using DNA markers in plants**. In: Birren, B. e Lai, E. (Eds) Analysis of non-mammalian genomes- a practical guide. Academic Press, New York . pp. 75-134.

REIS, M.S. 1996. **Distribuição e dinâmica de variabilidade genética em populações naturais de palmito (*Euterpe edulis* MARTIUS)**. 209p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

RICE, R.W. 1989. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v.43, p.223-225.

RICHARDS,A.J. 1986. **Plant Breeding Systems**. London:Allen e Unwin. 287p.

RITLAND, K. A series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems. **Journal of Heredity**, v.81: p.235-237, 1990.

RIVERA, R.; EDWARDS, K. J.; BARKER, J. H. A.; ARNOLD, G. M.; AYAD, G.; HODGKIN, T.; KARP, A. 1999. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in *Cocos nucifera* L. **Genome**, v. 42, p. 668-675.

RODRIGUES, D. P. 2007. **Diversidade genética e sistema de produção em progênes elites de pupunheira inerme (*Bactris gasipaes* Kunth) com marcadores microssatélites: implicações para o melhoramento do palmito**. Tese de Doutorado em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, 103 p.

RODRIGUES, D. P.; VINSON, C.; CIAMPI, A. Y.; FARIAS, P.; LEMES, M. R. ATOLFI-FILHO, S. and CLEMENT, C. R. 2004. Novel microsatellite markers for *Bactris gasipaes* (Palmae). **Molecular Ecology Notes**. 4, 575-576.

ROHLF, F.J. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. **Applied BioStatistics Incorporated**, New York. 1997.

SEKHON, M.S.; GUPTA, V.P. 1995. Genetic distance and heterosis in indian mustard: developmental isozymes as indicators of genetic relationships. **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, p.1148-1152

SCHROTH, G.; MOTA, M. S. S.; FREITAS, A. F. 2004. Extractive use, management and *in situ* domestication of a weedy palm, *Astrocaryum tucuma*, in the central Amazon. **Forest Ecology and Management** 202, 161-179.

SOARES, N. P. 2005. **Aproveitamento Industrial da polpa do tucumã**. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Amazonas, Manaus.

SOUZA, A. G. C.; SOUSA, N.R.; SILVA, S.E.L.; NUNES, C.D.M.; COUTO, A.C.; CRUZ, L.A.A. 1996. **Fruteiras da Amazônia**. Embrapa - SPI/Embrapa – CPAA, Brasília. 204p. (Biblioteca Botânica Brasileira, 1).

TAUTZ, D. & RENZ, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, 12: 4127-4138.

USDA. 2006 **Official Statistics, USDA Estimates**. United States Department Agriculture. Circular Fevereiro de 2006. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/oilseeds/circular/2006/06-02/table9.pdf>>. Acesso em 28 de março de 2006.

VINSON, C.C.; AZEVEDO, V.C.R.; SAMPAIO, I.; CIAMPI, A.Y. 2005. Development of microsatellite markers for *Carapa guianensis* (Aublet), a tree species from the Amazon Forest. **Molecular Ecology Notes**, v.5, p.33-34.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v.38, p.1358-1370.

WELCH, J. e MC CLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research** 18: 7213-7218.

WRIGHT, S. Systems of mating. 1921. **Genetics**, v.6, p.111-178.

WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v.15, p.323-354.

WRIGHT, S. 1965. The interpretation of population struture by F-statistics with special regard to system of mating. **Evolution**, v.19, p.395-420.

WHITE, G. M., POWELL, W. 1997a. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hard wood species. **Molecular Ecology** 6: 851-860.

WHITE, G. M., POWELL, W. 1997b. Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family. **Molecular Ecology**, 6: 1195-1197.

WHITLOCK, M. C.; McCAULEY, D. E. 1999. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \neq 1/(4Nm + 1)$. **Heredity**, v. 82, p. 117-125.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** 18: 6531-6535.

ZEHDI, S.; TRIFI, M.; BILLOTTE, N.; MARRAKCHI, M.; PINTAUD, J. C. 2004. Genetic diversity of Tunisian date palms (*Phoenix dactylifera* L.) revealed by microsatellite polymorphism. **Heredity**, v. 141, p. 278-287.