

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais de tucumã-do-
Amazonas por meio de microssatélites, visando o manejo e conservação da
espécie**

Santiago Linorio Ferreyra Ramos

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2014**

Santiago Linorio Ferreyra Ramos
Engenheiro Agrônomo

Estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais de tucumã-do-Amazonas por meio de microssatélites visando o manejo e conservação da espécie
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **ELIZABETH ANN VEASEY**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Ramos, Santiago Linorio Ferreyra

Estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais de tucumã-do-Amazonas por meio de microssatélites visando o manejo e conservação da espécie / Santiago Linorio Ferreyra Ramos. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.

120 p : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Amazônia 2. Arecaceae 3. *Astrocaryum aculeatum* 4. Desenvolvimento de microssatélites 5. Diversidade genética 6. Estrutura genética 7. Análise de paternidade 8. Estrutura genética espacial 9. Coeficiente de coancestria 10. Tamanho efetivo populacional I. Título

CDD 634.6
R175e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte -O autor"

Deus, por todas as bênças, ajuda, saúde e amor que brinda para mim e minha família.

A mi madre Josefita y mis hermanas Patricia y Leyla por su amor incondicional, porque siempre estuvieron incentivando mi realización personal. A los sabios consejos de mi padre Jose (in memoriam), a la candida ternura de mi abuelito Santiago (in memoriam, te extraño mucho) y abuelita Wilmer.

A meu amado e querido filho Oliver Benny Pimentel Ramos, você é dez, te amo. A Perla, por seu amor e compreensão, e sempre esteve pendente de nossa família.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À **DEUS** que é fonte de vida, inspiração, amor, saúde, inteligência e sabedoria.

À Prof^a. Dr^a. **Elizabeth Ann Veasey**, pela orientação, apoio em tudo, incentivo e, especialmente, por ter acreditado em mim quando apresentei este trabalho para sua realização. Fato que permitiu-me melhorar o meu desenvolvimento científico e profissional e, ainda, pela boa amizade nestes anos de trabalho.

Ao pesquisador da Embrapa Amazônia Ocidental e grande amigo **Jeferson Luis Vasconcelos de Macedo**. Obrigado pelos ensinamentos, incentivo, humildade no repasse de seus conhecimentos e, sobretudo, mais uma vez pela grande amizade que construímos durante todo este tempo e acredito que sem você nada tivesse dado certo.

À Prof^a. Dr^a. **Maria Teresa Gomes Lopes**, pela amizade, apoio, incentivo e, especialmente, por ter acreditado em mim desde que cheguei à este maravilhoso país. Permitindo-me crescer profissionalmente. Obrigado Teresa.

As pesquisadoras **Kyara Martins Formiga** e **Jacqueline da Silva Batista**, as pessoas mais incríveis que conheci que posso chamar de amigas. Obrigado por tudo e especialmente pela amizade, incentivo e ajuda nos trabalhos de sistema de detecção laser no Laboratório Temático de Biologia Molecular – INPA.

Ao programa de **Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ / Universidade São Paulo – USP**. Incluindo sua Infraestrutura e principalmente **aos excelentes professores** que brindam conhecimento de alta qualidade para seus estudantes. Obrigado, aprendi muito. Não esquecer a **seus funcionários**, obrigado pela oportunidade.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM**, pelos recursos financeiros concedidos através da bolsa de estudos dentro do programa RH - Doutorado.

As diferentes **Secretarias do Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas - IDAM**, órgão do Governo do estado do Amazonas, pelo apoio nas diferentes coletas material vegetal e frutos do Tucumã-do-Amazona.

A meu grande amigo **Gabriel Dequigiovanni** pela amizade, incentivo e colaboração, muito obrigado.

Meu querido amigo, acredito que sem você nada tivesse dado certo, obrigado **Fernando Luis Rocha**, mais conhecido como **Filó**.

A minhas amigas **Thais Melega** e **Adriana R. Pachon**, assim como a **Sueme Ueno** e **Mariana Novello** quando faziam parte de nosso laboratório, meus colegas de laboratório **Jucilene, Nancy, Tatiane** e **Patricia**.

Ao técnico de nosso laboratório **Marcos Cella**, no apoio nos diferentes momentos da minha pesquisa.

Ao Alessandro A. Pereira e **Juan C. G. Abad** pela grande amizade.

A meus maravilhosos amigos do LTBM-INPA **Izaura B. Francini, Adriel Lira, Saulo Machado, Juan Capurucho, Giselle M. G. Marques** e **Lucijane Carvalho**, obrigado por sua ajuda e principalmente por sua amizade.

A mi querida madre **Josefita Ramos Raiski**, por su amor y cariño infinito, por sus oraciones y su ejemplo de perseverancia en la búsqueda de nuestra felicidad familiar, así como para mis hermanas **Patrícia** e **Leyla**, por la unión, amor y cariño recibido. Siempre estaremos unidos, por más distancia que exista, porque siempre fuimos y seremos una familia unida. Mas una vez querida mamá Josefita, gracias por la educación, respeto, amor, solidaridad, entre otros valores de bien que nos brindastes.

A mi abuelito **Santiago Ramos Gonzales** (*In memorian*) y abuelita **Wilmer Ramos Raisky**, las dos mejores personas que pasaron por mi vida, me mostraron lo mejor de la vida, entre los diferentes valores para ser una persona de bien...muchas gracias, muchas gracias...les extraño mucho.

A minha família, especialmente a **Perla Pimentel da Silva** por tudo, muito obrigado. A **Oliver Benny Pimentel Ramos**, por todo seu amor que me brinda cada dia... Obrigado filho. Assim como a **Danilo** e **Sophia** por sua compreensão e carinho.

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

AGRADEÇO

A despeito de uma disciplina rigorosa, seja gentil para consigo mesmo. Portanto esteja em paz com Deus, como quer que você o conceba, e quaisquer que sejam seus trabalhos e aspirações, na fatigante jornada da vida, mantenha-se em paz com sua própria alma.

Você é filho do Universo, irmão das estrelas e árvores. Você merece estar aqui e mesmo que você não possa perceber a terra e o universo vão cumprindo o seu destino

“Max Ehrmann”

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
LISTA DE FIGURAS.....	17
LISTA DE TABELAS.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Objetivos.....	22
1.1.1 Objetivos específicos.....	22
1.2 Hipóteses.....	23
1.3 Revisão Bibliográfica	23
1.3.1 Distribuição e importância das palmeiras.....	23
1.3.2 Importância econômica do tucumã-do-Amazonas.....	23
1.3.3 Distribuição geográfica, taxonomia e descrição botânica do tucumã-do-Amazonas.....	24
1.3.4 Biologia reprodutiva do tucumã-do-Amazonas.....	28
1.3.5 Produção de sementes e mudas do tucumã-do-Amazonas.....	29
1.3.6 Processamento e comercialização do tucumã-do-Amazonas.....	30
1.3.7 Germoplasma e melhoramento genético do tucumã-do-Amazonas.....	31
1.3.8 Estudos de diversidade agro-morfológica e genética para o tucumã-do-Amazonas.....	32
Referências.....	32
2 LOCOS DE MICROSSATÉLITES PARA O TUCUMÃ-DO-AMAZONAS “ <i>Astrocaryum aculeatum</i> ” E SUA AMPLIFICAÇÃO EM OUTRAS ARECACEAE....	37
Resumo.....	37
Abstract.....	37
2.1 Introdução.....	37
2.2 Material e Métodos.....	39
2.2.1 Locais de amostragem e coleta de material vegetal.....	39
2.2.2 Extração e quantificação do DNA genômico das Amostras coletadas e para o desenvolvimento dos microssatélites.....	40
2.2.3 Construção de biblioteca genômica enriquecida com microssatélites do tucumã-do-Amazonas.....	41
2.2.4 Caracterização e amplificação dos microssatélites do tucumã-do-Amazonas.....	44

2.2.5 Transferência dos microssatélites do tucumã-do-Amazonas em outras Arecaceas.....	47
2.2.6 Índices de diversidade genética.....	47
2.3 Resultados e discussão.....	48
2.3.1 Desenho dos microssatélites.....	48
2.3.2 Caracterização dos locos microssatélites.....	48
2.3.3 Índices de diversidade genética nas populações de <i>Astrocaryum aculeatum</i>	49
2.3.4 Transferência dos microssatélites de <i>Astrocaryum aculeatum</i> para outras Arecaceas.....	49
2.4 Conclusões.....	50
Referências	53
3 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE TUCUMÃ-DO-AMAZONAS (<i>Astrocaryum aculeatum</i>) UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES, NO ESTADO DO AMAZONAS.....	57
Resumo.....	57
Abstract.....	58
3.1 Introdução.....	58
3.2 Material e Métodos.....	61
3.2.1 Área de estudo, local de amostragem e identificação das plantas.....	61
3.2.2 Extração e quantificação do DNA genômico de <i>Astrocaryum aculeatum</i>	64
3.2.3 Amplificação dos microssatélites para de tucumã-do-Amazonas.....	65
3.2.4 Análise estatística dos dados.....	66
3.3 Resultados.....	68
3.3.1 Índices de diversidade genética.....	68
3.3.2 Estrutura genética.....	72
3.4 Discussão.....	81
3.4.1 Índices de diversidade genética	81
3.4.2. Estrutura genética.....	83
3.5 Conclusões.....	89
Referências.....	89
4 DISPERSÃO DE PÓLEN, DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL EM POPULAÇÃO NATURAL DE <i>Astrocaryum aculeatum</i> NA AMAZÔNIA BRASILEIRA.....	95

Resumo.....	95
Abstract.....	95
4.1 Introdução.....	96
4.2 Material e Métodos.....	98
4.2.1 Área de estudo.....	98
4.2.2 Amostragem.....	99
4.2.3 Amplificação dos microssatélites no DNA de <i>Astrocaryum aculeatum</i>	101
4.2.4 Análise estatística.....	102
4.2.4.1 Diversidade genética e índice de fixação.....	102
4.2.4.2 Análise da estrutura genética espacial.....	102
4.2.4.3 As estimativas de coancestria do grupo e tamanho efetivo da população.....	103
4.2.4.4 Análises do fluxo e dispersão do pólen.....	103
4.3 Resultado.....	104
4.3.1 Diversidade genética.....	104
4.3.2 Análise da estrutura genética espacial (EGE)	106
4.3.3 Coancestria e tamanho efetivo da população.....	106
4.3.4 Análise de paternidade, padrões de fluxo e de dispersão do pólen.....	107
4.4 Discussão.....	108
4.4.1 Diversidade genética.....	108
4.4.2 Estrutura genética espacial (EGE)	111
4.4.3 Coancestria e tamanho efetivo da população.....	112
4.4.4 Fluxo e padrões de dispersão do pólen.....	112
4.4.5 Implicações para a conservação, o cultivo de árvores e colheita de sementes.....	114
4.5 Conclusões.....	115
Referências.....	115

RESUMO

Estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais de tucumã-do-Amazonas por meio de microssatélites visando o manejo e conservação da espécie

O tucumã-do-Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*), da família Arecaceae, é uma espécie com ocorrência na Amazônia Ocidental e Central brasileira. Seu fruto é muito apreciado na região amazônica que consome a polpa na forma fresca. Sua produção é feita pelos agricultores extrativistas. Não existem informações dos parâmetros de diversidade e estrutura genética das populações naturais desta espécie, fundamental para o estabelecimento de estratégias adequadas no uso deste recurso genético, e para aumentar a eficiência da domesticação e seleção para um programa de melhoramento genético. Não é conhecido também como este extrativismo pode estar influenciando a diversidade entre estas populações ao nível dos genitores e progênies, o fluxo gênico e a estrutura genética espacial. Assim, o objetivo desta pesquisa foi caracterizar a estrutura e a diversidade genética de populações de *A. aculeatum* no Estado do Amazonas, utilizando marcadores microssatélites. Como objetivos específicos o estudo visou desenvolver iniciadores de microssatélites para *A. aculeatum*; avaliar a diversidade e a estrutura genética; determinar o fluxo gênico, bem como o grau de parentesco, a estrutura genética espacial (EGE) e o coeficiente de coancestria numa população. Os iniciadores de microssatélites foram isolados a partir de uma biblioteca genômica enriquecida e caracterizados usando 40 amostras provenientes de duas populações selvagens. Foram identificados 14 iniciadores de microssatélites, mostrando um alto polimorfismo nas populações avaliadas. Para estimar a diversidade e estrutura genética foram utilizadas amostras de material vegetal de 218 plantas distribuídas em 15 populações, localizadas em 14 municípios do estado de Amazonas. Foram identificados 101 alelos nos iniciadores, com média de 10,1 alelos. As médias das heterozigosidades observadas (H_O) foram superiores às esperadas (H_E) ao nível de população ($H_O=0,639$, $H_E=0,557$) e locos ($H_O=0,639$; $H_E=0,594$). Os baixos valores de F_{ST} (0,07) mostraram uma moderada estrutura populacional e a análise Bayesiana indicou um agrupamento mais adequado de $k=4$, o que foi confirmado pelas análises de PCoA. Para realizar o fluxo gênico, EGE e coeficiente de coancestria foram utilizadas 244 amostras de material vegetal, distribuídas entre 112 possíveis genitores, 12 matrizes e 120 progênies numa população. Foi detectada EGE significativa para os adultos até a distância de 50 m, indicando dispersão de sementes a curtas distâncias. A análise de paternidade detectou 9,2% de imigração de pólen. Não foram detectadas autofecundações e a distância média de polinização dentro da população foi de 81 m. Os índices de diversidade genética confirmaram a estratégia reprodutiva por alogamia da espécie, com níveis elevados de heterozigotos nas populações, e a estrutura genética sugere que a espécie teria iniciado o processo de formação das subpopulações há pouco tempo, tendo sido influenciada antes e após o início do desmatamento. O fluxo gênico detectado indica que a entrada de alelos na população através da imigração de pólen está contribuindo para manutenção da diversidade genética da população. Com relação à conservação da espécie, esta deve ser realizada ao nível das bacias hidrográficas, direcionando políticas de manejo para as bacias hidrográficas da Amazônia. Entretanto, dentro da população é importante a renovação com novas progênies selecionadas a partir de um espaçamento mínimo de 50 m entre plantas matrizes para diminuir as probabilidades de coletar sementes de plantas parentes.

Palavras-chave: Amazônia; Arecaceae; *Astrocaryum aculeatum*; Desenvolvimento de microssatélites; Diversidade genética; Estrutura genética; Análise de paternidade; Estrutura genética espacial; Coeficiente de coancestria; Tamanho efetivo

ABSTRACT

Genetic structure and gene flow in natural populations of tucum palm by microsatellite aiming at the management and conservation of the species

The tucum palm (*Astrocaryum aculeatum*), family Arecaceae, is a species occurring in Western and Central Brazilian Amazon. Its fruit is widely appreciated in the Amazon region that consumes the pulp in fresh form. Its production is made by extractive farmers. There is no information on the genetic diversity and structure of natural populations of this species, fundamental to establishing adequate strategies in the use of this genetic resource, increase the efficiency of domestication and selection for a breeding program. It is also unknown the way this extrativism may be influencing to diversity of these populations at the level of the parents and offspring, as well as gene flow and spatial genetic structure. Therefore, the objective of this research was to characterize the structure and genetic diversity of populations of *A. aculeatum* in Amazonas State, using microsatellite markers. As specific objectives, the study aimed to develop microsatellite primers for *A. aculeatum*; evaluate the genetic diversity and structure; determine the gene flow, the degree of relationship or kinship, the spatial genetic structure (SGS) and the coefficient of coancestry in one population. The loci were isolated from a microsatellite-enriched genomic library and were characterized using 40 samples coming from two wild populations. Fourteen microsatellite primers were identified, showing a high polymorphism in the populations evaluated. To estimate the genetic diversity and structure we used samples of plant material from 218 plants distributed in 15 populations located in 14 municipalities of the state of Amazonas. A total of 101 alleles were identified in the primers, with an average of 10.1 alleles. The averages of the observed heterozygosities (H_O) were higher than the expected heterozygosities (H_E) at the population ($H_O=0.639$; $H_E=0.557$) and loci ($H_O=0.639$; $H_E=0.594$) levels. The low values of F_{ST} (0.07) showed a moderate population structure and the Bayesian analysis indicated as the most suitable a cluster of $k=4$, confirmed by the groups formed in the PCoA. To conduct gene flow, SGS and the coefficient of coancestry, 244 samples of plant material were used, distributed among 112 possible progenitors, 12 matrices and 120 progenies in a population. A significant SGS was detected for adult trees up to the distance of 50 m, indicating seed dispersal over short distances. Paternity analysis indicated 9.2% of pollen immigration. Selfing was not detected and the average distance of pollination within the population was 81 m. The genetic diversity indices confirmed the outcrossing reproductive strategy of the species with high levels of heterozygotes in the populations, and the genetic structure suggests that the species would have started the process of formation of subpopulations a short time ago, being influenced before and after the start of deforestation. The gene flow detected indicates that the entry of alleles in the population through pollen immigration is contributing to the maintenance of genetic diversity of the population. With respect to the conservation of the species, it should be performed at the level of the river basins, directing management policies for the river basins of the Amazon. However, within the population it is important to renew with new progenies selected from a minimum spacing of 50 m between plant matrices to decrease the probability of collecting seeds from plant relatives.

Keywords: Amazon; Arecaceae; *Astrocaryum aculeatum*; Microsatellites development; Tucum palm; Genetic diversity; Genetic structure; Paternity analysis; Spatial genetic structure; Coancestry coefficient; Effective size

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Planta de Tucumã-do-Amazonas (<i>Astrocaryum aculeatum</i>) em condições naturais.....	26
Figura 1.2 - Inflorescência completa do tucumã-do-Amazonas (A) com detalhes das flores masculinas e femininas (B).....	27
Figura 1.3 - Frutos do tucumã-do-Amazonas (A) com detalhes da sua constituição interna e externa (B).....	28
Figura 2.1 - Locais de coleta da espécie <i>Astrocaryum aculeatum</i> em áreas de produtores extrativistas em dois municípios do estado do Amazonas.....	40
Figura 3.1 - Locais de coleta da espécie <i>Astrocaryum aculeatum</i> , em áreas de produtores extrativistas. A) Totalizando 15 populações, localizadas em 14 municípios do estado de Amazonas.....	62
Figura 3.2 - Valores das medias das medias $\ln \Pr(X K)$ para cada valor de K obtidas pela análise Bayesiana. O maior valor $\ln \Pr(X K)$ representa o valor ideal de K de acordo com o proposto por Pritchard, Stephens e Donnelly (2000).....	75
Figura 3.3 - Análise da estrutura genética das 228 matrizes selecionadas nas 15 populações de <i>Astrocaryum aculeatum</i> a partir de 10 locos microssatélites, indicando que os genótipos foram classificados em dois possíveis agrupamentos K=3 e K=4. As populações foram agrupadas no sentido de região norte, sul e centro do Amazonas.....	75
Figura 3.4 - Representação geográfica da composição genética das 228 matrizes selecionadas nas 15 populações de <i>Astrocaryum aculeatum</i> a partir de 10 locos microssatélites, estimado no programa structure (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000).....	76
Figura 3.5 - Análise das coordenadas principais mostrando os três primeiros eixos (A, os eixos coord.1 e 2; B, eixos das Coord. 1 e 3) com base nas comparações do FST par a par do <i>Astrocaryum aculeatum</i> . As cores representam os agrupamentos obtidos no valor de K=4 obtida na análise Bayesiana.....	79

- Figura 3.6 - Dendrograma obtido pelo método de “Neighbor-Joining” através das distâncias genéticas de Nei (NEI, 1978). As populações marcadas em vermelho são oriundas de municípios próximas a capital Manaus. As populações marcadas com roxo são oriundas do alto rio Madeira, e as de cor verde mostram as populações que se encontram no baixo rio Madeira. Enquanto os marcados em azul são populações do rio Uatumã. 80
- Figura 3.7 - Representação geográfica comparativa dos resultados obtidos para os diferentes agrupamentos do: (A) dendrograma (Figura 3.6) método de “Neighbor-Joining”, e (B) análise da estrutura (Figura 3.3) realizadas no programa Structure (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000)... 80
- Figura 4.1 - Local de coleta de uma população natural da espécie *Astrocaryum aculeatum*, na propriedade Najatuba, em Manaus, AM, Brasil..... 101
- Figura 4.2 - Correlograma do coeficiente de coancestria médio (θ_{xy}) de genitores (plantas adultas) de uma população de *Astrocaryum aculeatum* para 10 classes de distância máxima (para cada intervalo) que foram definidos pelo programa SPAGeDI (HARDY; VEKEMANS, 2002). A linha contínua representa o valor médio de θ_{xy} . As linhas tracejadas representam o intervalo de confiança “IC” de 95% (de duas caudas) da distribuição média de θ_{xy} calculada a partir de 10 000 permutações de distância espacial entre os pares de plantas adultas amostradas..... 106
- Figura 4.3 - Dispersão do pólen dos genitores identificados em cada uma das matrizes dentro de uma população de *Astrocaryum aculeatum* obtidas por meio de análise de paternidade. As setas com tracejados (—), (--) e (··) indicam a dispersão do pólen. A) Genitores para as matrizes M04(—), M05 (--), M06 (--) e M07 (··). B) Genitores para as matrizes M15 (—), M37 (··), M40 (··) e M41(--). C) Genitores para as matrizes M45 (—), M47 (--), M48 (--) e M49 (··)..... 109
- Figura 4.4 - Frequência efetiva da dispersão de pólen e a distância entre as árvores reprodutivas doadoras de pólen e as árvores mães das progenies em uma população de *Astrocaryum aculeatum*..... 110

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Sequências dos iniciadores de microssatélites identificados, incluindo o nome do iniciador, motivo de repetição e tamanhos dos fragmentos em pares de bases (pb).....	45
Tabela 2.2 - Caracterização de locos de microssatélite desenvolvidos para <i>Astrocaryum aculeatum</i> em duas populações do estado de Amazonas.....	51
Tabela 2.3 - Transferência de 14 iniciadores de microssatélites desenvolvidas para <i>Astrocaryum aculeatum</i> em outras seis espécies da família Arecaceae. Incluindo a extensão do iniciador em pares de base (pb) e o número de alelos (A) por espécie.....	52
Tabela 3.1 – Identificação precisa dos locais de coleta realizadas nas 15 populações, localizadas em 14 municípios do estado de Amazonas.....	63
Tabela 3.2 – Índices de diversidade genética ao nível dos locos (iniciadores) de microssatélite obtidos a partir das 15 populações de <i>Astrocaryum aculeatum</i> coletadas no estado de Amazonas.....	69
Tabela 3.3 – Índices de diversidade genética ao nível das 15 populações, obtidas a partir de 10 locos de microssatélites desenvolvidos para <i>Astrocaryum aculeatum</i>	70
Tabela 3.4 – Resultados obtidos para o número de combinações com desequilíbrio de ligação (<i>LD</i>), porcentagem do <i>LD</i> (<i>LD%</i>), alelos privados e valores do equilíbrio de Hardy-Weinberg obtido independentemente para cada um dos 10 locos de microssatélites em cada uma das 15 populações de <i>Astrocaryum aculeatum</i>	71
Tabela 3.5 – Resultados das estimativas das estatísticas <i>F</i> de Wright (1951) obtidas para 15 populações de <i>Astrocaryum aculeatum</i> utilizando 10 locos de microssatélites específicos.....	72
Tabela 3.6 – Comparações do <i>F_{ST}</i> par a par entre as 15 populações de <i>Astrocaryum aculeatum</i> coletadas no estado de Amazonas.....	73
Tabela 3.7 - Comparações do <i>F_{ST}</i> par a par entre as sete bacias hidrográficas de acordo como as 15 populações de <i>Astrocaryum aculeatum</i> coletadas no estado de Amazonas.....	73

Tabela 3.8 – Análise da variância molecular (AMOVA) realizado para 15 populações de <i>Astrocaryum aculeatum</i> coletadas no estado de Amazonas.....	74
Tabela 4.1 - Matrizes mostrando o numero de progênies obidas após o processo de germinação e emergência de <i>Astrocaryum aculeatum</i>	99
Tabela 4.2 - Diversidade genética e índice de fixação de palmeiras adultas e progênies de <i>Astrocaryum aculeatum</i> , em uma população de produção extrativista. A é o número de alelos, A_p é o número de alelos exclusivos em cada geração; H_E e H_o são as heterozigosidades esperada e observada; f_A e f_p são os índices de fixação para adultos e progênies; P_{Exc2} é a probabilidade teórica de não exclusão combinado para o par de genitores.....	105
Tabela 4.3 – Dispersão do pólen e migração dentro de famílias avaliadas por meio de análise de paternidade de uma população de <i>Astrocaryum aculeatum</i>	107

1 INTRODUÇÃO

Esta tese apresenta a pesquisa realizada com o tucumã-do-Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*), palmeira do trópico úmido com importância econômica baseada principalmente no uso de seus frutos, cuja polpa tanto é consumida ao natural como na elaboração de diversos produtos. Foram os frutos que tornaram o tucumã emblemático em Manaus a partir de meados da década de noventa, a ponto de ter sido considerada a palmeira que melhor representa a capital amazonense (MOUSSA; KAHN, 1997), levando a desenvolver um importante mercado na região central da Amazônia com estes frutos, que gera emprego e renda para uma grande parte da população que vive na capital e nas localidades aonde a palmeira é encontrada (SCHROTH et al., 2004). Ela é muito utilizada em lanchonetes e cafés regionais na elaboração de sanduíches, principalmente o “x-caboquinho”, muito apreciado pela população local e pelos turistas. Os frutos também podem ser utilizados como complemento alimentar para animais domésticos, além de se extrair óleo da polpa e das amêndoas que podem ser utilizados como insumo para produção de biocombustível ou para uso na alimentação humana e na indústria de cosméticos, sendo que o endocarpo é utilizado na fabricação de artesanatos.

Atualmente, o mercado de tucumã é atendido quase exclusivamente pela exploração extrativista. Essa oferta é quase permanente, mas heterogênea ao longo do ano, e se deve ao fato de os frutos serem oriundos de diversas localidades, onde ocorrem diferenças no período de frutificação, devido à variação na estação chuvosa. Esse comércio vem crescendo a cada ano, sinalizando a necessidade de se aumentar a produção de frutos para atendimento dessa demanda no mercado, e o bom preço pago pelos frutos têm despertado interesse dos agricultores no plantio de tucumã, mas não existe disponibilidade de material genético selecionado para o estabelecimento de plantios, pois são poucas e recentes as tentativas de melhoramento da espécie, tanto *in situ* como através de métodos convencionais.

Desta maneira, diferentes estudos têm gerado informações sobre as características agro-morfológicas de *A. aculeatum*, como altura da planta, produção e qualidade dos frutos, sabor, rendimento e conteúdo de fibra e óleo na polpa e na amêndoa, produção de mudas (RAMOS et al., 2008, 2011a; LOPES et al., 2012). Porém, estudos sobre os parâmetros de diversidade e estrutura genética inter e intrapopulacional em populações naturais ainda são escassos (RAMOS, 2008; RAMOS et al., 2012). Estas informações são fundamentais para a conservação e o melhoramento do tucumã-do-Amazonas.

Os recursos genéticos são estudados em várias etapas, iniciando pela coleta, introdução, multiplicação, conservação, caracterização e avaliação, regeneração e

multiplicação para distribuição do germoplasma. Porém, no estabelecimento de estratégias de uso e conservação dos recursos genéticos, é necessário ter informações do sistema reprodutivo da espécie, para subsidiar as etapas de domesticação e pré-melhoramento genético para contribuir na interpretação de mecanismos relacionados à polinização, e assim poder relacionar este comportamento nos estudos de diversidade e estrutura genética. Nos últimos anos, os marcadores genético-moleculares têm sido empregados para auxiliar diferentes estudos genéticos de diversas espécies vegetais, especialmente para o conhecimento da estrutura genética interpopulacional e intrapopulacional de populações naturais. O desenvolvimento de iniciadores de microssatélites específicos para uma espécie permite a valorização do recurso genético, porque quando empregados poderá gerar informações sobre a estrutura genética com base nas estimativas das frequências alélicas e genotípicas, permitindo estimar a magnitude e a distribuição da variabilidade entre e dentro das populações, o fluxo gênico existente entre populações, possibilitando a melhoria e eficiência no programa de melhoramento genético.

1.1 Objetivos

Caracterizar a estrutura e a diversidade genética de populações de tucumã-do-Amazonas (*A. aculeatum*) no Estado do Amazonas, utilizando marcadores microssatélites.

1.1.1 Objetivos específicos

Desenvolver iniciadores de microssatélites específicos para *A. aculeatum*;

Avaliar a variabilidade genética inter e intrapopulacional de tucumã-do-Amazonas por meio de índices de diversidade genética;

Avaliar o fluxo gênico para determinar o grau de relacionamento ou parentesco numa população natural espontânea, assim como a estrutura genética espacial e o coeficiente de coancestria.

1.2 Hipóteses

Espera-se encontrar elevados níveis de diversidade genética em populações naturais espontâneas do tucumã-do-Amazonas, porque a espécie realiza cruzamentos aleatórios, evento esperado em populações naturais panmíticas.

Espera-se encontrar a maior parte da variabilidade genética alocada dentro de populações do que entre populações, porque os estudos prévios do sistema reprodutivo, baseados em uma única população, indicaram acasalamentos aleatórios e porque os indivíduos na população apresenta protoginia.

Espera-se encontrar uma estruturação no espaço para populações de tucumã-do-Amazonas, porque é esperado que o fluxo gênico ocorra preferencialmente entre indivíduos mais próximos espacialmente.

1.3 Revisão Bibliográfica

1.3.1 Distribuição e importância das palmeiras

As palmeiras (Arecaceae) apresentam mais de 2400 espécies, e estas são agrupadas dentro das subfamílias Arecoideae, Calamoideae, Ceroxyloideae, Coryphoideae e Nypoideae, que se encontram distribuídas nas regiões tropicais e sub-tropicais em todo o mundo, com diferentes padrões de riqueza espacial de acordo com a variação geográfica, mostrando maior abundância quanto mais próximos da linha do Equador (DRANSFIELD et al., 2005; GOVAERTS; DRANSFIELD, 2005; EISERHARDT et al., 2011). As palmeiras são relatadas como um dos grupos de plantas mais úteis ou importantes ao homem, especialmente as comunidades rurais, porque sempre forneceram materiais de construção, tecidos, combustível, alimentos, plantas ornamentais e medicamentos (SOSNOWSKA; BALSLEV, 2009).

Na floresta tropical da Amazônia brasileira, encontra-se a palmeira nativa *Astrocaryum aculeatum*, conhecida popularmente como tucumã-do-Amazonas, de significativa importância econômica e social para o estado do Amazonas (KAHN; GRANVILLE, 1992).

1.3.2 Importância econômica do tucumã-do-Amazonas

A importância econômica do tucumã-do-Amazonas está baseada principalmente no uso de seus frutos, cuja polpa tanto é consumida ao natural como na elaboração de diversos produtos. Ela é muito utilizada em lanchonetes e cafés regionais na elaboração de sanduíches, principalmente o “x-caboquinho”, muito apreciado pela população local e pelos turistas. Os frutos também podem ser utilizados como complemento alimentar para animais domésticos,

além de se extrair óleo da polpa e das amêndoas que podem ser utilizados como insumo para produção de biocombustível (BARBOSA et al., 2009; LIRA, 2012) ou para uso na alimentação humana e na indústria de cosméticos, sendo que o endocarpo é utilizado na fabricação de artesanatos (KAHN; MOUSSA, 1999; RAMOS et al., 2011a; LOPES et al., 2012).

Atualmente, o tucumã-do-Amazonas apresenta grande potencial econômico, cuja polpa chega a ser comercializada entre R\$ 30,00 a 50,00 o quilograma (DIDONET, 2012). A produção de frutos do tucumã que atende o mercado de Manaus é quase exclusivamente pela exploração extrativista, que se originam de aproximadamente 25 municípios, incluindo além do Amazonas, o Estado do Pará e o Sul do Estado de Roraima. Devido à diversidade da origem dos frutos, esse mercado é abastecido durante quase todo o ano. Entretanto, no pico do verão (agosto a outubro) constata-se uma redução expressiva na oferta de frutos e, também, no número de municípios fornecedores. Essa oferta quase permanente, mas heterogênea ao longo do ano, se deve ao fato dos frutos serem oriundos de diversas localidades, onde ocorrem diferenças no período de frutificação, devido à variação na estação chuvosa (DIDONET, 2012).

Esse comércio vem crescendo a cada ano, sinalizando a necessidade de se aumentar a produção de frutos para atendimento dessa demanda. Segundo Lopes et al. (2012), o aumento da demanda no mercado e o bom preço pago pelos frutos têm despertado interesse dos agricultores no plantio de tucumã, mas não existe disponibilidade de material genético selecionado para o estabelecimento de plantios, pois são poucas e recentes as tentativas de melhoramento da espécie, tanto *in situ* como através de métodos convencionais.

1.3.3 Distribuição geográfica, taxonomia e descrição botânica do tucumã-do-Amazonas

No Brasil, *A. aculeatum* tem ocorrência circunscrita à Amazônia Ocidental e Central Brasileira (LOPES et al., 2012), especificamente nos estados do Acre, Pará, Rondônia, Roraima e Amazonas (KAHN, 2008), sendo este último seu provável e mais importante centro de diversidade genética (LLERAS; GIACOMETTI; CORADIN, 1983).

Na Amazônia o tucumã-do-Amazonas ocorre no ecossistema de terra firme e, por estarem frequentemente associados a ambientes que sofreram ação antrópica (pastagens, roçados, capoeiras), deduz-se que esta espécie seja tolerante a solos pobres e degradados (FAO, 1987). A espécie apresenta potencial para integração em sistemas agroflorestais ou agrossilvopastoris, podendo ser utilizada para aproveitamento de áreas degradadas (COSTA,

2000). Cruzando os dados da localização geográfica de algumas populações naturais de tucumã que foram mapeadas para coleta de material vegetal no estado do Amazonas entre os mapas digitalizados de solos do projeto RADAMBRASIL, observa-se que o tucumã pode ocorrer em diferentes tipos de solos, principalmente nas associações com Latossolo Amarelo (70% das populações mapeadas), o que indica que a espécie apresenta plasticidade fenotípica para esse recurso ambiental.

O tucumã-do-Amazonas é classificado dentro da família Arecaceae, subfamília Arecoideae, Tribo Bactridinae, gênero *Astrocaryum* (DRANSFIELD et al., 2005), subgênero *Astrocaryum*, seção *Astrocaryum* e subseção *Astrocaryum* (KAHN, 2008). Esta divisão taxonômica é realizada em base a características do fruto, flores e partes vegetativas (KAHN, 2008). Esta espécie apresenta sinonímias, como: a) *A. tucuma* Mart.; b) *A. aureum* Griseb. & H. Wendl.; c) *A. caudenscens* Barb. Rodr.; d) *A. princeps* Barb. Rodr.; e) *A. jucuma* Linden; f) *A. manaoense* Barb. Rodr. e f) *A. macrocarpum* Huber (KAHN; MILLÁN, 1992; HENDERSON; SCARIOT, 1993).

No Brasil, a espécie *Astrocaryum aculeatum* é conhecida pelos nomes populares de tucumã, tucumã-açu, tucumã-arara, tucumã-uassu-rana, tucumã-piririca, tucumã-piranga, tucum-assu, tucum-bravo, tucum-da-serra, tucum-do-mato e tucum-purupuru (KHAN, 2008). Em outros países de ocorrência da espécie, ela é conhecida como chonta, tucumo, panima (Bolívia); akuyuro palm, cuyuru-palm, tucumou (Guiana); amana, toekoemau, warau (Suriname); cumare e yavaide (Venezuela) (KHAN, 2008).

A espécie *A. aculeatum* apresenta estipe solitário, ereto, que pode atingir até 30 m de altura. O tronco apresenta anéis (ou entrenós) com presença e ausência de espinhos negros, finos, longos e pungentes (Figura 1.1). Esta característica do estipe está relacionada com o crescimento da planta, o que indica que no anel que não apresenta espinhos, esteve presente a base de uma folha. As folhas são pinadas e reduplicadas com pecíolo e raque longa, pina irregularmente arranjada em agrupamentos dispostos em diferentes planos, apresentando cor branca acinzentada na parte abaxial, medindo de 4 a 6 m de comprimento e apresentando espinhos por toda sua extensão, embora sejam mais frequentes na bainha (CAVALCANTE, 1996; KAHN; MILLÁN, 1992; HENDERSON; SCARIOT, 1993). Em geral, o número de folhas em plantas adultas pode variar de 8 e 24, porém, estudos realizados em 18 populações naturais no Estado do Amazonas, constataram que em média, o número de folhas nas plantas que se encontram na fase produtiva varia entre 11 e 16 folhas.



Figura 1.1 Planta de tucumã-do-Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) em condições naturais. Autor: Jeferson Luis Vasconcelos de Macêdo

A inflorescência é envolvida por uma espata que se torna intumescida ao se desenvolver, evento que dura de 30 a 45 dias até a sua abertura, por meio de uma fenda longitudinal. A espata possui cor predominantemente preta, devido à concentração de espinhos, variando de cinza a castanho até sua abertura. A cor das inflorescências varia entre indivíduos, ocorrendo desde creme esverdeado a cinza. A inflorescência é pedunculada, interfoliolar e apresenta tamanho médio que varia entre 1,4 e 1,8m de comprimento. Cada inflorescência apresenta em média 432 ráquulas com flores unissexuais (BACELAR-LIMA; MENDONÇA; BARBOSA, 2006).

As flores femininas são maiores e ocorrem em menor quantidade, cerca de 500 a 1.500 flores pistiladas, situadas na parte basal das ráquulas da espádice e possuem três pétalas aderidas ao estigma. Já as flores masculinas são actinomorfas e diplostêmones, e ocorrem em maior quantidade, cerca de 180.000 a 260.000 flores estaminadas, ocupando a porção mediana e apical da ráquila (Figura 1.2). Ambas são de coloração bege e do tipo cálice (BACELAR-LIMA; MENDONÇA; BARBOSA, 2006). A antese das flores femininas é vespertina ficando viáveis por 24 horas. As masculinas iniciam sua antese após o término das femininas ficando viáveis por apenas 6 horas (BACELAR-LIMA; MENDONÇA; BARBOSA, 2006). Cada indivíduo pode produzir de duas a doze inflorescências por ano (MOUSSA; KAHN, 1996).



Figura 1.2 - Inflorescência completa do tucumã-do-Amazonas (A) com detalhes das flores masculinas e femininas (B). Autor: Jeferson Luis Vasconcelos de Macêdo

Os frutos do tucumã (Figura 1.3) são drupas subglobosas a elipsóides, medindo de 3,0 a 8,0 cm de comprimento e 2,5 a 5,6 cm de largura, com peso variando de 30 a 150 g, apresentam cálice e corola persistentes; o epicarpo pode ser liso ou quebradiço com consistência dura, possui colorações que variam do verde a amarelado e combinações entre estas, mede de 0,7 a 2,0 mm de espessura; o mesocarpo mede entre 1,5 e 10,0 mm de espessura, é compacto, firme, variando de fibroso a levemente fibroso, oleaginoso e com colorações variadas que pode ser amarelada, alaranjada ou avermelhada, e suas combinações; o endocarpo, de coloração negra a pardo-acizentada, é consistente, lenhoso, variando de 3,0 a 5,5 cm de comprimento, com diâmetro entre 2,5 e 5,0 cm e pesam entre 16 e 90 g; o tegumento da semente mede de 1,7 a 5,0 mm de espessura e apresentam três poros, dispostos como vértices de um triângulo, sendo um deles fértil; em geral, ocorre uma semente por fruto, mas pode apresentar sementes duplas. O endosperma na parte externa apresenta forma sólida, homogênea, consistente e branca e na parte interna um líquido incolor (FAO, 1987; KHAN; MILLÁN, 1992; CAVALCANTE, 1996; MIRANDA et al., 2001).



Figura 1.3 - Frutos do tucumã-do-Amazonas (A) com detalhes da sua constituição interna e externa (B). Autor: Jeferson Luis Vasconcelos de Macêdo

1.3.4 Biologia reprodutiva do tucumã-do-Amazonas

É uma espécie monóica, em que os indivíduos apresentam os dois sexos na mesma planta, com separação morfológica das flores masculinas e femininas nas inflorescências, o que contribui para evitar a autofecundação. Essa característica, aliada ao fato da espécie apresentar protoginia, sugere que a espécie seja alógama (BACELAR-LIMA; MENDONÇA; BARBOSA, 2006). Para confirmar esta hipótese, Ramos et al. (2011b) estimaram os parâmetros do sistema de reprodução da espécie, a partir de progênies de polinização aberta obtidas de uma população natural na região de Manaus, avaliadas com oito locos microssatélites. Estes autores verificaram neste estudo uma taxa de cruzamento de 97,8% e apenas 2,2% das plântulas provenientes de autofecundação, confirmando que o tucumã é uma espécie alógama. A taxa de cruzamento de 97,8% inclui 80,6% de cruzamentos aleatórios (meios-irmãos dentro da progênie) e 17,2% de cruzamentos correlacionados (irmãos completos dentro das progênies). Quanto à taxa de 2,2% de autofecundação, essa se distribuiu entre 1,98% de endogamia uniparental (autopolinização) e 0,22% de endogamia biparental (cruzamento entre parentes). A maioria das progênies de tucumã-do-Amazonas avaliada neste estudo, também mostrou a presença de diferentes fontes de pólen, apresentando em média material genético proveniente de 5,0 indivíduos.

Na região de Manaus, o período de frutificação do tucumã-do-Amazonas ocorre de fevereiro a agosto, com pico de produção no mês de abril. A floração se estende de julho a janeiro. Contudo, em certas ocasiões pode ocorrer uma leve frutificação no período de outubro e novembro – pleno período da floração – devido a uma leve floração ocorrida no mês de abril (MOUSSA; KAHN, 1996).

O padrão de dispersão primária de *A. aculeatum* consiste na chuva de sementes, geralmente concentrada no raio de projeção da copa (3,5 m). A dispersão secundária é feita por cutias (*Dasyprocta aguti*) que enterram as sementes próximas às plantas, para consumo posterior, em distâncias inferiores a 15 m (BACELAR; PESSONI, 2000). Entretanto, a maior dispersão do tucumã-do-Amazonas tem sido feita pelo homem que transporta os frutos de plantas consideradas “de boa qualidade” de uma localidade para outra.

1. 3.5 Produção de sementes e mudas do tucumã-do-Amazonas

Os esforços empreendidos até o momento para promover a domesticação e o domínio tecnológico que permitam viabilizar a exploração econômica de *A. aculeatum*, ainda não resultaram em recomendações de cultivares ou linhagens, por se tratar de uma espécie perene, que apresenta um longo período de imaturidade produtiva.

Como ainda não há disponibilidade de sementes de material melhorado, o produtor deve iniciar o plantio de tucumã-do-Amazonas a partir da coleta dos frutos dos indivíduos nas populações naturais que apresentem características desejáveis como alta produção, elevado número de cachos e de frutos no cacho, fruto grande e pesado, alta percentagem de polpa no fruto, ausência ou pouca fibra na polpa, polpa adocicada, alto conteúdo de óleo na polpa, entre outros. As plantas selecionadas como fornecedoras de sementes (matrizes) deverão ser identificadas e preservadas para futuras coletas.

A propagação do tucumã é feita exclusivamente por sementes, as quais apresentam germinação lenta, irregular e frequentemente baixa. Em condições naturais, as sementes da espécie levam de dois (SÁ, 1984) até três anos para germinar (KOEBERNIK, 1971). Contudo, essa dormência pode ser superada pela retirada do endocarpo após a secagem da semente (MIRANDA et al., 2001) e pela embebição das sementes em água (GENTIL; FERREIRA, 2005; FERREIRA; GENTIL, 2006; RAMOS et al., 2009; RAMOS et al., 2011a).

Para propagação é recomendável que os frutos sejam coletados no chão, após o seu desprendimento do cacho. Outra possibilidade é a coleta do cacho quando os primeiros frutos caem naturalmente. Porém, constatou-se que o tucumã-do-Amazonas apresenta maturação desuniforme do cacho, iniciando geralmente pelos frutos da base e por último os frutos do ápice. Por isso, antes de se coletar o cacho, recomenda-se verificar o grau de maturação do mesmo, coletando-se de dois a três frutos da base e do ápice, analisando a coloração da polpa de ambas as extremidades dos frutos. O cacho estará “de vez” por completo, quando a coloração da polpa apresentar a mesma tonalidade de cor, tanto nos frutos da base quanto do

ápice. Caso verifique-se que o cacho ainda tem frutos verdes, recomenda-se deixá-lo na planta por mais alguns dias e realizar nova verificação da maturação antes da colheita (RAMOS et al., 2009).

É importante e recomendável coletar sementes de várias plantas selecionadas como matrizes em uma mesma população e, se possível, em outras populações, para garantir a diversidade genética e polinização cruzada (RAMOS, 2008), que é característica dessa espécie. Após a coleta dos frutos, deve-se retirar a polpa para facilitar a secagem dos caroços. Para tanto, os caroços devem ser espalhados e colocados para secar na sombra, em um local coberto, seco e com temperatura variando entre 30° a 40° C. Nessas condições, os caroços levam em torno de um mês para secar (RAMOS, 2008).

1.3.6 Processamento e comercialização do tucumã-do-Amazonas

Nas feiras e no mercado, os frutos são selecionados pelos comerciantes por tamanho e qualidade (sabor). Estes são comercializados sob duas formas: (i) ao natural, sob a forma de frutos, vendidos em dúzia ou cento; e (ii) beneficiados pelo processo de despulpamento manual realizado pelos próprios comerciantes, sendo a polpa comercializada por peso. Entretanto, os frutos maiores e de melhor sabor (nem sempre) são vendidos aos consumidores, por dúzia, a preços que variam de R\$ 3,00 a 6,00. Os frutos menores e de qualidade inferior, são descascados e despulpados. A polpa - normalmente extraída sem os cuidados básicos de higiene - é comercializada embalada em sacos plásticos, a preços que variam entre R\$ 30,00 e R\$ 50,00/kg. Estima-se que sejam comercializadas mais de 400 toneladas de frutos/ano nas principais feiras e mercados de Manaus (DIDONET, 2012).

O mesocarpo (polpa) dos frutos apresenta quantidades expressivas de fibras, precursores de vitamina A e óleo, este último considerado comestível, de coloração amarela, possuindo características organolépticas e nutritivas de alto valor para a indústria de alimentos e de cosméticos. Souza e Marinho (2010), estudando a composição química dos frutos de três espécies de *Astrocaryum*, constataram que os frutos de *A. aculeatum* possuem teores de beta e alfa-caroteno em torno de 7.530 e 2.597µg/100g, respectivamente, e teores de Vitamina A da ordem de 368 (RE/100g). O betacaroteno é um pigmento natural que além de desempenhar a função de antioxidante, é também uma provitamina que se converte em vitamina A no organismo.

O consumo do tucumã vem gerando como resíduo o caroço (endocarpo), que contém uma amêndoa, a partir da qual se pode extrair óleo de excelente qualidade, que pode ser utilizado como matéria-prima para produção de sabão, cosméticos e medicamentos

(CAVALCANTE, 1996). O óleo extraído das amêndoas também já foi testado para produção de biodiesel através de métodos de catálise ácida e básica onde foram obtidos rendimentos superiores a 90% e 60 %, respectivamente. Em ambos os casos, foi possível identificar um excelente potencial de produção de biocombustível (BARBOSA et al., 2009; LIRA, 2012).

1. 3.7 Germoplasma e melhoramento genético do tucumã-do-Amazonas

O melhoramento genético do tucumã-do-Amazonas deve ser orientado para a seleção de genótipos com alta produtividade e qualidade de fruto (rendimento de polpa, sabor, cor, conteúdo de fibra e óleo), reduzido crescimento vertical do estipe (plantas mais baixas) e precocidade de produção (LOPES et al., 2012). Além disso, a identificação e a seleção de genótipos que produzam fora do período típico ou de maior concentração da produção, na entressafra, podem contribuir para a oferta regular de frutos no mercado no decorrer do ano.

O método de seleção individual de plantas é uma estratégia que permite a obtenção de resultados mais rápidos para espécies perenes. As coleções mantidas *ex situ* são recentes e ainda não se dispõem de resultados de avaliação do material conservado. Contudo, a seleção *in situ* apresenta-se como boa estratégia, uma vez que muitas populações são exploradas pelos extrativistas que tem conhecimento empírico de quais são as melhores plantas com relação à produção e qualidade de fruto (LOPES et al., 2012).

A Embrapa Amazônia Ocidental está realizando estudos para seleção de indivíduos superiores de tucumã em populações naturais do estado do Amazonas e já tem identificado e catalogado, com ajuda dos produtores extrativistas, 290 indivíduos superiores pela qualidade dos frutos (sabor, cor, tamanho, fibra e óleo) e pelo porte da planta, provenientes de 16 populações, distribuídas em 15 municípios. Foram também identificados os 15 melhores indivíduos de cada população, sendo que no município de Manaus foram identificadas e catalogadas 50 plantas matrizes. Dessas plantas identificadas e catalogadas nas populações naturais, coletaram-se frutos daquelas com características excepcionais (seleção massal), cujas progênes estão enviveiradas no Campo Experimental do Caldeirão da Embrapa Amazônia Ocidental, em Iranduba-AM, para o estabelecimento de um banco de germoplasma, como meta do projeto “Pesquisa, desenvolvimento e inovação em palmáceas para a produção de óleo e aproveitamento econômico de co-produtos e resíduos – PROPALMA”, processo nº 01.10.0343.00, coordenado pela Embrapa.

1.3.8 Estudos de diversidade agro-morfológica e genética para o tucumã-do-Amazonas

Estudos iniciais têm gerado informações sobre as características agro-morfológicas de *A. aculeatum* como altura da planta, produção e qualidade dos frutos, sabor, rendimento e conteúdo de fibra e óleo na polpa e na amêndoa (SCHROTH et al., 2004; RAMOS et al., 2011a). Outros trabalhos já defiram a produção de mudas (RAMOS et al., 2009; RAMOS et al., 2011a) assim como o sistema reprodutivo (RAMOS et al., 2011b) do tucumã-do-Amazonas. É importante investir em pesquisas que procurem informações sobre os parâmetros de diversidade e estrutura genética inter- e intrapopulacional em populações naturais e propagação por meio de técnicas de cultivo *in vitro*, como uma estratégia para a multiplicação de genótipos de qualidade em um curto espaço de tempo. Estas informações são fundamentais para a conservação e o melhoramento do tucumã-do-Amazonas. Nesta tese são apresentados os avanços nas pesquisas desenvolvidas para os parâmetros de diversidade e estrutura genética para a espécie.

Referências

- BACELAR-LIMA, C G.; PESSONI, L.A. Estrutura populacional do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) na Estação Ecológica de Maracá, RR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS AGROFLORESTAIS, 3., 2000, Manaus. Manejando a biodiversidade e compondo a paisagem rural: **Anais...** Manaus: Universidade do Amazonas - Imprensa Universitária. 2000. p. 180-182.
- BACELAR-LIMA, C.G.; MENDONÇA, M.S.; BARBOSA, T.C.T.S. Morfologia floral de uma população de tucumã *Astrocaryum aculeatum* G. Mey (Arecaceae) na Amazônia central. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 36, p. 407-412, Dez. 2006.
- BARBOSA, B.S.; KOOLEN, H.H.F.; BARRETO, A.C.; SILVA, J.D. da; FIGLIUOLO, R.; NUNOMURA, S.M. Aproveitamento do óleo das amêndoas de tucumã do Amazonas na produção de biodiesel. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 39, p. 371-376, 2009.
- CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 6.ed. Belém, PA: CNPq/Museu Paraense Emilio Goeldi. 1996. 279p.
- COSTA, J.R. da. O tucumã (*Astrocaryum aculeatum* G.F.W. Meyer): uma espécie de potencial agroflorestal para a terra firme do Estado do Amazonas-Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS AGROFLORESTAIS, 3., 2000, Manaus. **Anais...** Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2000. p.232-234. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 7).

DIDONET, A.A. **O mercado de um produto florestal não madeireiro e o resíduo sólido gerado pela sua comercialização: o caso do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* G. Mey.) nas feiras de Manaus.** 2012. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Florestas Tropicais) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2012.

DRANSFIELD, J.; UHL, N.W.; ASMUSSEN, C.B.; BAKER, W.J.; HARLEY, M.M.; LEWIS, C.E. A new phylogenetic classification of the palm family, Arecaceae. **Kew Bulletin**, London, v. 60, p. 559-569, Sept. 2005.

EISERHARDT, W.L.; SVENNING, J-C.; KISSLING, W.D.; BALSLEV, H. Geographical ecology of the palms (Arecaceae): determinants of diversity and distributions across spatial scales. **Annals of Botany**, Oxford, v. 108, p. 1391–1416, June 2011.

FAO. **Especies Forestales Productoras de Frutas y Otros Alimentos, 3. Ejemplos de América Latina.** Roma: Estudio FAO Montes 44/3. 1987. 265p. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/015/an785s/an785s00.pdf>>. Acesso em: 14 Ago. 2013.

FERREIRA, S.A.N.; GENTIL, D.F.O. Extração, embebição e germinação de sementes de tucumã *Astrocaryum aculeatum*. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 36, p. 141-146, abr. 2006.

GENTIL, D.F.O.; FERREIRA, S.A.N. Morfologia da plântula em desenvolvimento de *Astrocaryum aculeatum* Meyer (Arecaceae). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 35, p. 337-342, jul. 2005.

GOVAERTS, R.; DRANSFIELD, J. **World checklist of palms.** Richmond: Royal Botanic Gardens Kew, 2005. 236 p. HENDERSON, A.; SCARIOT, A.A. Flora da Reserva Ducke, 1: Palmae (Arecaceae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 23, p. 349-369, dez. 1993.

KAHN, F. Las palmeras en América del Sur. The Genus *Astrocaryum* (Arecaceae). **Revista Peruana de Biología**, Lima, v. 15, p.31-48, nov. 2008.

KAHN, F.; MOUSSA, F. Economic importance of *Astrocaryum aculeatum* (Palmae) in Central Brazilian Amazonia. **Acta Botanica Venezuelica**, Caracas, v.22, n.1, p.237–245, Jan. 1999.

KAHN, F.; GRANVILLE, J.J. de. Palms and Forest Management in Amazonia. In: _____. **Palms in Forest Ecosystems of Amazonia.** Berlin: Springer Berlin Heidelberg/Ecological Studies v. 95, 1992, Chap. 7, p. 155-167.

KAHN, F.; MILLÁN, F. *Astrocaryum* (Palmae) in Amazonian a preliminary treatment. **Bulletin de l'Institut Français d'Etudes Andines**, Lima, v. 21, p.459-531, Aug. 1992.

KOEBERNIK, J. Germination of palm seed. **Principes – Journal of the Palm Society**, Austin, v.15, p.134-137, Oct. 1971.

- LIRA, C.S. **Pirólise rápida da semente de tucumã-do-Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*): caracterização da biomassa *in-natura* e dos produtos gerados**. 2012. 156 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.
- LLERAS, E.; GIACOMETTI, D. C.; CORADIN, L. Áreas críticas de distribución de palmas en las Americas para colecta, evaluación y conservación. In: FAO. **Informe de la reunión de consulta sobre palmeras poco utilizadas de América Tropical**. Turrialba: FAO, 1983. p. 67-101.
- LOPES, M.T.G.; MACÊDO, J.L.V.D.; LOPES, R.; LEEUWEN, J.V.; RAMOS, S.L.F.; BERNARDES. Domestication and breeding of the Tucum Palm. In: BORÉM, A.; LOPES, M.T.G.; CLEMENT, C.R.; NODA, H. (Eds). **Domestication and breeding: Amazonian species**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2012. chap. 20, p. 421-436.
- MIRANDA, I.P.A.; RABELO, A.; BUENO, C.R.; BARBOSA, E.M.; RIBEIRO, M.N.S. **Frutos de palmeiras da Amazônia**. Manaus: Creative, 2001. 120p.
- MOUSSA, F.; KAHN, F. A importância econômica do tucumãzeiro de Manaus, *Astrocaryum aculeatum*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ECOSSISTEMAS FLORESTAIS, 4, 1996, Belo Horizonte.: **Anais...**Belo horizonte: Biosfera, 1996. p. 172.
- MOUSSA, F.; KAHN, F. Uso y potencial económico de dos palmas, *Astrocaryum aculeatum* Meyer y *A. vulgare* Martius, en la Amazonía brasileña. In: RIOS, M.; PEDERSEN, H.B. (Ed.). **Uso y manejo de recursos vegetales**. SIMPOSIO ECUATORIANO DE ETNOBOTÁNICA Y BOTÁNICA ECONÓMICA, 2. 1997. Quito. **Memórias...** Quito:Abya-Yala, 1997. p.101-116.
- RAMOS, S.L.F. **Sistema reprodutivo de tucumãzeiro (*Astrocaryum aculeatum* G. Meyer)**. 2008. 71p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.
- RAMOS, S.L.F.; MACEDO, J.L.V.; LOPES, M.T.G.; BATISTA, J.S.; FORMIGA, K.M.; DA SILVA, P.P.; SAULO-MACHADO, A.C.; VEASEY, E.A. Microsatellite loci for tucumã of Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) and amplification in other Arecaceae. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 99, p. e508–e510, Dec. 2012.
- RAMOS, S.L.F.; MACÊDO, J.L.V. de; MARTINS, C.C.; LOPES, R.; LOPES, M.T.G. Tratamentos pré-germinativos e procedência de sementes do tucumã-do-Amazonas para a produção de mudas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, p. 962-969, Sept. 2011a.

RAMOS, S.L.F.; LOPES, M.T.G.; LOPES, R.; CUNHA, R.N.V. da; MACÊDO, J.L.V. de; CONTIM, L.A.S.; CLEMENT, C.R.; RODRIGUES, D.P.; BERNARDES, L.G. Determination of the mating system of Tucumã palm using microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 11, p. 181–185, June 2011b.

RAMOS, S.L.F.; MACÊDO, J.L.V.; LOPES, S.S.; RAMOS, L.F.F. **Técnicas para facilitar a germinação das sementes de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer)**. Manaus: Embrapa, AM – Brasil. Dezembro, 2009. 6 p. (Embrapa Amazônia Ocidental, Comunicado Técnico, 77)

SÁ, S.T.V. **Superação da dormência de sementes de tucumã (*Astrocaryum tucuma* Mart.)**. 1984. 53p. Monografia (trabalho de conclusão de curso de Engenharia Agrônômica) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade do Amazonas, Manaus, 1984.

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

SOSNOWSKA, J.; BALSLEV, H. American palm ethnomedicine: A meta-analysis. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, London, v. 5, p. 43-53, Dec. 2009.

SOUZA, R.O.S.; MARINHO, H.A. **Determinação de carotenóides com e sem pró-vitamina A de três espécies de tucumã no estado do Amazonas (*Astrocaryum vulgare*, *A. acuelatum* e *A. acaule*)**. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PIBIC INPA – CNPq/FAPEAM, 19., 2010, Manaus. Disponível em: <<http://pibic.inpa.gov.br/biologicas/SAUDE/RodrigoOtavioSilvadeSouza.pdf>>. Acesso em: 10 Set. 2013.

2 LOCOS DE MICROSSATÉLITES PARA O TUCUMÃ-DO-AMAZONAS “*Astrocaryum aculeatum*” E SUA AMPLIFICAÇÃO EM OUTRAS ARECACEAE

Resumo

Locos de microssatélites foram desenvolvidos para tucumã-do-Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) e estes foram amplificados em outras seis espécies de Arecaceae, para investigar a diversidade genética e estrutura populacional e para fornecer suporte para o manejo de populações naturais. Quatorze locos de microssatélites foram isolados a partir de uma biblioteca genômica enriquecida com microssatélites e usada para caracterizar duas populações selvagens (Manaus e Manicoré) de tucumã-do-Amazonas. Os locos caracterizados apresentaram alto polimorfismo para ambas as populações de *A. aculeatum*, com uma média de heterozigosidade observada de 0,498. As taxas de amplificação encontradas na transferência em quatro espécies de *Astrocaryum* e duas espécies adicionais de Arecaceae variaram de 50% a 93%. A informação obtida a partir dos marcadores microssatélites desenvolvidos oferece ganhos significativos para a conservação da riqueza alélica da espécie e serve de apoio para a implementação de várias estratégias de melhoramento para o tucumã-do-Amazonas.

Palavras-chave: Amazônia; Arecaceae; *Astrocaryum aculeatum*; Desenvolvimento de microssatélites; Tucuma-do-Amazonas

Abstract

Microsatellite loci were developed for tucumã of Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*), and cross-species amplification was performed in six other Arecaceae, to investigate genetic diversity and population structure and to provide support for natural populations management. Fourteen microsatellite loci were isolated from a microsatellite-enriched genomic library and used to characterize two wild populations (Manaus and Manicoré) of tucum palm. The investigated loci displayed high polymorphism for both *A. aculeatum* populations, with a mean observed heterozygosity of 0.498. Amplification rates ranging from 50% to 93% were found for four *Astrocaryum* species and two additional species of Arecaceae. The information derived from the microsatellite markers developed here provides significant gains for the allelic richness conservation and supports the implementation of several molecular breeding strategies for the Amazonian tucumã.

Keywords: Amazon; Arecaceae; *Astrocaryum aculeatum*; Microsatellites development; Tucum palm

2.1 Introdução

As palmeiras (Arecaceae) apresentam mais de 2400 espécies, agrupadas nas subfamílias Arecoideae, Ceroxyloideae, Coryphoideae e Calamoideae. Estas se encontram distribuídas nas regiões tropicais e sub-tropicais do planeta, apresentando diferentes padrões de riqueza espacial de acordo com a variação geográfica, e sempre mostrando maior abundância quanto mais próximos da linha do Equador (GOVAERTS; DRANSFIELD, 2005; EISERHARDT et al., 2011). As palmeiras são relatadas como um dos grupos de plantas mais úteis ou importantes ao homem, especialmente as comunidades rurais, porque sempre

forneceram materiais de construção, tecidos, combustível, alimentos, plantas ornamentais e medicamentos (SOSNOWSKA; BALSLEV, 2009).

Na Amazônia Brasileira, algumas espécies pertencentes à subfamília Arecoideae do gênero *Astrocaryum* têm destaque por apresentar potencial econômico no âmbito regional e nacional. Uma destas espécies, o tucumã-do-Amazonas (*A. aculeatum*), tem ocorrência circunscrita à Amazônia Ocidental e Central Brasileira (LOPES et al., 2012), sendo que seu provável centro de origem (SOUZA et al., 1996) e de diversidade genética (LLERAS; GIACOMETTI; CORADIN, 1983) é o estado do Amazonas. Esta espécie ocorre em ecossistemas de terra firme e, mais comumente, em áreas desmatadas ou que sofreram alguma ação antrópica (FAO, 1987; MIRANDA et al., 2001). O potencial econômico do tucumã-do-Amazonas é devido à polpa do fruto, rica em beta caroteno, que é muito apreciada pela população da região amazônica, que a consome na forma fresca. Das sementes e da polpa podem ser extraídos óleos para uso na alimentação humana e na área de cosméticos. O endocarpo é usado no artesanato (RAMOS et al., 2011a; LOPES et al., 2012). Entretanto, todo este potencial é limitado porque não existe uma técnica de manejo e produção para a espécie, e sua disponibilidade do fruto é quase exclusivamente pela exploração extrativista, apresentando ofertas irregulares, tanto em quantidade como em qualidade. O aumento da demanda no mercado e o bom preço pago pelos frutos têm despertado interesse no plantio desta espécie pelos agricultores da região de Manaus (AM), mas não existe disponibilidade de material selecionado para o estabelecimento dos plantios. Porém, umas das etapas para o processo de domesticação do *A. aculeatum* é conhecer a diversidade e estrutura genética disponível nas populações naturais, além de outras características como altura da planta, produção e qualidade dos frutos, em tamanho, rendimento de polpa, sabor, conteúdo de fibra e óleo (SCHROTH et al., 2004; RAMOS et al., 2011a).

O emprego de marcadores moleculares permitem auxiliar no estudo de diversas espécies vegetais, que dependendo da base genética do marcador permite a identificação e diferenciação entre eles por sua expressão genética, que é definida como dominante ou co-dominante (FALEIRO, 2007), ajudando a medir o grau de polimorfismos em uma ou mais populações de indivíduos, dando resposta a questões importantes em estudos de genética populacional e também abordagens ecológicas e evolução (DAVEY et al., 2011). Um destes marcadores co-dominantes importantes são os microssatélites ou Sequências Simples Repetidas (SSR, *Sequence Simple Repeats*), utilizados amplamente no contexto da conservação genética, para estimar a variação genética, estrutura populacional, fluxo gênico, história demográfica e eventos de hibridação (OUBORG et al., 2010).

O conhecimento da diversidade e estrutura genética interpopulacional e intrapopulacional de populações naturais de tucumã (*A. aculeatum*) são fundamentais para o estabelecimento de estratégias adequadas no uso destes recursos genéticos, e assim, nas etapas de um programa de melhoramento genético da espécie. O desenvolvimento de iniciadores de microssatélites específicos para o tucumã do Amazonas é útil na valorização destes recursos genéticos, e quando empregados poderá gerar informações sobre a estrutura genética com base nas estimativas das frequências alélicas e genotípicas, permitindo estimar a magnitude e a distribuição da variabilidade entre e dentro das populações, o fluxo gênico existente entre populações, possibilitando a melhoria e eficiência no programa de melhoramento genético do tucumã-do-Amazonas. Atualmente, os esforços para fornecer subsídios à domesticação de *A. aculeatum* têm sido empreendidos, mas são poucas as informações disponíveis que possam indicar a superioridade genética das populações naturais para a produção e qualidade dos frutos e de seu óleo. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver *primers* (iniciadores) de microssatélites específicos para *A. aculeatum*, assim como avaliar a diversidade genética inter e intrapopulacional de tucumã-do-Amazonas por meio de índices de diversidade genética.

2.2 Material E Métodos

2.2.1 Locais de amostragem e coleta de material vegetal.

Para este estudo foram amostradas duas populações, localizadas nos municípios de Manaus e Manicoré, ambos no estado de Amazonas (Figura 2.1). Em cada população foram amostradas 20 plantas ao acaso, o que representa 40 plantas. De todas as plantas selecionadas para amostragem nas populações foi coletado um folíolo e armazenado em um saco plástico tipo *zip lock* previamente identificado, contendo sílica gel, até que pudesse ser conservado a -20°C no Laboratório Temático de Biologia Molecular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LTBM - INPA), Manaus, AM.

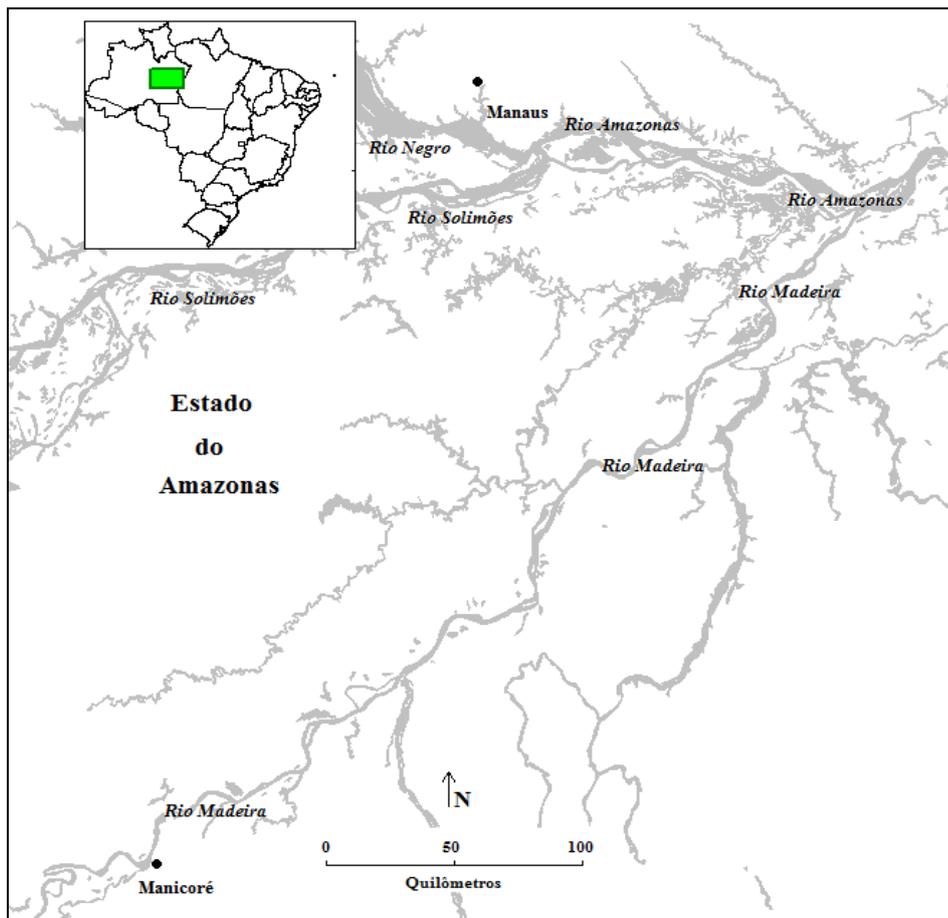


Figura 2.1 - Locais de coleta da espécie *Astrocaryum aculeatum* em áreas de produtores extrativistas em dois municípios do estado do Amazonas. Mapa criado por S.L.F. Ramos, utilizando o programa DIVA-GIS v. 7.5 (DIVA-GIS, 2012)

2.2.2 Extração e quantificação do DNA genômico das Amostras coletadas e para o desenvolvimento dos microsatélites

O DNA genômico total foi extraído de acordo com o protocolo do detergente catiônico CTAB 2X (Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide) descrito por Doyle e Doyle (1990). Este DNA genômico foi extraído dos folíolos coletados nas populações naturais. De cada uma destas amostras foi retirado 100 mg de tecido foliar, fragmentado em pedaços bem pequenos, e colocados em um gral de porcelana onde foi adicionado 800 μ L de detergente de extração CTAB 2X, e foram macerados com auxílio de um bastão de porcelana. O produto resultante da maceração de cada uma das amostras foi depositado em tubo *Eppendorf* de 1,5 mL de capacidade, previamente identificado. Em seguida, em cada amostra foi acrescentado 2 μ L de 2- β -mercaptoetanol 1%, as quais foram colocadas em banho-maria a uma temperatura de 60°C durante 30 minutos, sendo homogeneizado a cada 10 minutos. Em seguida, foram colocadas para esfriar e, logo após, foi adicionado 600 μ L de Clorofórmio com Álcool

Isoamílico, na proporção 24:1 (CIA). Depois, os tubos foram centrifugados a uma velocidade de 14.000 rpm por 12 minutos. Posteriormente, foi pipetada toda a fase aquosa de cada uma das amostras, e transferida para um novo microtubo de 1,5 mL. Nesse tubo foi adicionado 400 µL de Isopropanol gelado (-20 °C) para permitir a precipitação do DNA. O material foi incubado por 12 horas (*overnight*) a -20 °C. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 7.500 rpm por 10 minutos, permitindo identificar o *pellet* no fundo do tubo. Logo foi eliminado o Isopropanol. Na sequência se acrescentou por duas vezes 1000 µL de etanol absoluto a 70% no *pellet* de cada amostra por 10 minutos. Logo, se acrescentou uma única vez 1000 µL de etanol absoluto a 100% por três minutos, retirando-se em seguida o máximo possível deste etanol. Em seguida, os tubos *Eppendorf* com o *pellet* foram colocados a secar na bancada a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 75 µL de solução tampão TE (Tris-HCl e EDTA) acrescido de RNase (10 µg/mL). As amostras foram incubadas por duas horas a 37°C e vortexadas de 30 em 30 minutos para a digestão da RNase. O material final foi armazenado a -20 °C.

A quantificação do DNA genômico foi realizada em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 1X, através de comparações visuais com padrões de massa molecular de 50, 100 e 200 ng/µL de DNA do fago lambda. Os géis foram corados com o corante *Blue Green* (1mg/mL) para a visualização das bandas de DNA. A corrida de eletroforese foi realizada a uma voltagem de 110 V durante o período de 60 minutos. E o gel foi fotografado e avaliado com auxílio de um fotodocumentador. Após a quantificação do DNA concentrado, foi necessário diluir o DNA a uma concentração de 10 ng/µL com água ultrapura. O material final foi armazenado a -20 °C.

2.2.3 Construção de biblioteca genômica enriquecida com microssatélites do tucumã-do-Amazonas

A construção da biblioteca genômica enriquecida para microssatélites de *A. aculeaum* seguiu a metodologia descrita por Billotte et al. (1999), com algumas modificações. A digestão do DNA genômico e a separação dos fragmentos foram realizadas com a enzima de restrição *Afa I* (5'-GT↓AC-3'; 3'-CA↓TG-5') procurando obter os fragmentos de DNA situados entre 200 e 800 pares de bases (pb). Estes foram visualizados em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE 1X com 0,2 µg/mL de *Blue Green*, utilizando um marcador de fragmentos de tamanho conhecido (100 a 1500 pb = 1 Kb *plus* de DNA). Logo, com o produto obtido, foi realizado o enriquecimento dos fragmentos para microssatélites, que foi iniciado com a pré-amplificação, que consistiu com o preparo e ligação dos adaptadores

Rsa21 (5'CTCTTGCTTACGCGTGGACTA3') e *Rsa25* (5'TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGC ACA3') adicionando a enzima T4 DNA ligase. Estes adaptadores possuem uma extremidade coesiva de acordo com os sítios gerados pela enzima utilizada na etapa de digestão do DNA total, em outras palavras, estes adaptadores *Rsa21* e *Rsa25* são compatíveis com a enzima *Afa I*. A ligação dos adaptadores na extremidade do DNA digerido permitiu posteriormente a amplificação do DNA pelos *primers* complementares à sequência do adaptador. A amplificação via PCR foi realizada com os fragmentos digeridos, procurando amplificar a maior quantidade de fragmentos e garantir que a ligação tenha ocorrido com os adaptadores compatíveis com a enzima *RsaI*. Posteriormente, o produto obtido da PCR foi purificado com *QIAquick PCR purification Kit* (Qiagen, Germantown, Maryland, USA) para realizar o enriquecimento da biblioteca genômica, através da hibridização do produto purificado com os dois oligonucleotídeos biotinizados simultaneamente, conhecidos como sondas de Biotina (CT)₈ e (GT)₈. Este procedimento envolveu a ligação de sondas marcadas com biotina a esferas magnéticas recobertas por estreptavidina - *Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles* (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Como biotina e estreptavidina possuem uma alta afinidade, forma-se uma ligação estável, que permite a utilização das sondas ligadas a esferas magnéticas para selecionar fragmentos de interesse através da utilização de um ímã. Após o passo de hibridização e várias lavagens para remover os fragmentos não específicos, o DNA foi eluído e recuperado. Após esta etapa, os fragmentos hibridizados foram amplificados por PCR a fim de permitir o enriquecimento dos fragmentos contendo microssatélites.

Este DNA amplificado, contendo os adaptadores *Rsa21* e *Rsa25* e as sondas de Biotina (CT)₈ e (GT)₈, foi ligado ao vetor de clonagem plasmidial *pGEM-T easy vector* (Promega, Madison, Wisconsin, USA) e transformado dentro de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* TOP10 cells (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) com o auxílio do eletroporador (Eppendorf, Hamburg, Germany) programado para 1900 volts, de modo que os fragmentos contendo microssatélites ligados ao vetor de clonagem (inserto) sejam inseridos nas bactérias competentes a fim de gerar clones recombinantes. Posteriormente, o produto das células transformadas foi cultivado sobre o meio Luria-Bertani (LB) agar, contendo 50 µg/mL IPTG e X-Gal a uma temperatura de 37°C para o crescimento noturno, e estocadas a 4°C posteriormente.

Após o passo anterior, foi realizada a triagem da biblioteca e seleção de clones com microssatélites, iniciando pela identificação dos clones recombinantes. Os clones contendo inserto formam colônias brancas, e estas foram selecionadas com auxílio de palitos estéreis e

transferidas para placas de lise (com fundo em U) contendo meio LB líquido, no qual cresceram isoladamente por 16 horas. Posteriormente, foram amplificados os clones da biblioteca genômica utilizando os *primers* universais T7F e SP6R, a fim de verificar e selecionar os clones transformados contendo os insertos. Logo, foi realizada a extração do DNA plasmidial das colônias recombinantes, que foi realizada inoculando os clones em placas tipo *deep well* e colocadas para crescimento à 37° C com 300 rpm por 22 horas em meio de cultura *circle grow*. Depois esta foi centrifugada para sedimentar as células. A extração do DNA plasmidial propriamente dita foi realizada com o auxílio das soluções GET (Glicose + EDTA + Tris), RNase (10mg/mL), NaOH (0,2 M), SDS 1% e KOAc (3M) e o produto obtido foi precipitado com isopropanol 100%, seguido de etanol 70% e centrifugado. Ao final do procedimento, o DNA plasmidial foi ressuspensão em água ultrapura.

Para o sequenciamento nucleotídico dos clones recombinantes foram realizadas duas reações para cada clone, uma reação com o *primer* T7 (*forward*) e outra com o *primer* SP6 (*reverso*), entre 40 e 100 ng do produto de PCR purificado juntamente com o reagente *Big Dye terminator kit v3.1* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), tampão 2X e água ultrapura. O preparo da reação foi segundo as recomendações do fabricante. Após a precipitação com isopropanol 95% e etanol 65% a reação de sequenciamento foi eletroinjetada no equipamento ABI 3130XL *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

O desenho dos iniciadores foi realizado primeiramente, verificando, editando e compilando as sequências nucleotídicas com o auxílio dos programas BIOEDIT 7.0.9.0 (HALL, 1999) e CHROMAS 2.23 (<http://technelysium.com.au/>). As sequências de DNA com insertos de melhor qualidade foram selecionadas e analisadas com o auxílio do programa WEBSAT (MARTINS et al., 2009) para a identificação das sequências com regiões de microssatélites e caracterização da biblioteca genômica. Foram considerados microssatélites do tipo dinucleotídeos aqueles com mais de cinco repetições; trinucleotídeos, com quatro ou mais repetições; tetra e penta nucleotídeos com três ou mais repetições. Os iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa *PRIMER3* (UNTERGASSER et al., 2012) implementado no programa WEBSAT (MARTINS et al., 2009). Os critérios utilizados para o desenho foram: tamanho entre 17 e 23 pb; temperatura de anelamento entre 55 e 65°C, conteúdo de guanina-citosina (GC) entre 50 e 80%, e fragmentos entre 100 e 450 pb de tamanho. Em cada iniciador *forward* a ser desenhado foi adicionada uma sequência universal, a calda M13 (tgtaaacgacggccagt) na extremidade 5', para uso do método econômico na etapa

de genotipagem (SCHUELKE, 2000). Posteriormente, os iniciadores foram sintetizados para serem avaliados (Tabela 2.1).

2.2.4 Caracterização e amplificação dos microssatélites do tucumã-do-Amazonas

Os iniciadores sintetizados, contendo os fragmentos de microssatélites, foram caracterizados e amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em um volume total de 10 μ L para cada reação. Esta continha 10 ng de DNA genômico, 1X buffer, 210 μ M de cada dNTP, 1,5mM de $MgCl_2$, 0,16 μ M de iniciador *forward* e calda M13 (FAM or NED) (SCHUELKE, 2000), 0,32 μ M de iniciador *reverse*, 1,05 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) e 3,49 μ L de água ultra pura. Estas amplificações via PCR foram desenvolvidas em duas etapas, a primeira etapa é específica para os iniciadores e a segunda para realizar a ligação do M13. A primeira etapa inicia estabilizando a temperatura a 68°C por 2 minutos e logo a 92°C por 30 segundos. Na sequência são realizados 30 ciclos do processo de desnaturação a 92°C por 30 segundos, seguido do anelamento por 35 segundos (temperaturas de cada iniciador caracterizado na Tabela 2.2) e a extensão a 68°C ou de 72°C por 35 segundos (Tabela 2.2). Na segunda etapa do M13 foram realizados 15 ciclos do processo de desnaturação a 92°C por 20 segundos, seguido do anelamento a 53°C por 30 segundos e da extensão a 72°C por 30 segundos, finalizando com uma extensão a 72°C por 15 minutos seguida de 68°C por 30 minutos (RAMOS et al., 2011b). As amostras foram amplificadas usando o termociclador *Veriti* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

Do produto obtido das PCRs, 2 μ L foi utilizado para realizar a eletroforese por 90 minutos em corrente 80V. Esta permitiu visualizar o grau de intensidade das PCRs no gel de agarose a 1,5% de acordo as recomendações do equipamento de eletroforese capilar. Os produtos da PCR de boa qualidade foram submetidos à eletroforese capilar no Analisador automático de DNA *ABI 3130XL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) e poder assim determinar os tamanhos dos alelos com o auxílio do marcador com tamanhos de fragmentos conhecidos, *ET-550 ROX size standard* (GE Healthcare, Amersham, Buckinghamshire, UK). As genotipagens foram observadas e analisadas com o auxílio do programa *GENEMAPPER v4.0 software* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

Tabela 2.1 – Sequências dos iniciadores de microssatélites identificados, incluindo o nome do iniciador, motivo de repetição e tamanhos dos fragmentos em pares de bases (pb)

Iniciador	Sequência do iniciador	pb	Motivo de repetição	Tamanho fragmento
Aac01F	*CACATGGTTCCTCCTCGTTC	20	(ATCACT)2	338
Aac01R	GCGAAAGGGTATAGTCAGCG	20		
Aac02F	*CGATTTGAGTCCGATGTG	18	(GCCATG)2	288
Aac02R	GCAGTTGTGTGTCTGGTTCT	20		
Aac03F	*GCCTCCTTTAGTTCCTGCAC	20	(TCCTAC)2	146
Aac03R	AGCATCGGACTTTCCAGGT	19		
Aac04F	*ATGGACTGCAAGCCCTTTG	19	(GT)6 (GA)8 gt (GA)5	159
Aac04R	GTTCCAAGCAGAGTGTGATAGC	22		
Aac05F	*GCATTGTCATCTGCAACCAC	20	(GT)7(GA)16	229
Aac05R	GCAGGGGCCATAAGTCATAA	20		
Aac06aF	*CCGTTTCAAGGACACCAGAT	20	(TA)6	114
Aac06aR	AAAACACCCACTTCTCACGC	20		
Aac06bF	*GCGTGAGAAGTGGGTGTTT	19	(GTGTGC)2 (GT)5 (GA)7	139
Aac06bR	CAGGCCACATATTAGGAATGTA	22	(GGA)2	
Aac07F	*GTCCAATTCAGCTCGGCTT	19	(TACGCT)2	365
Aac07R	TTATGCAATGGTGGTGTGTGT	20		
Aac08F	*GGGGAAAGGACCACAGAGTT	20	(GGTATG)2	219
Aac08R	GGAGAAGAGGATTCAAAGAGGAG	23		
Aac09F	*AGCGTAATAGCATCCCTTGC	20	(TG)6	248
Aac09R	AGTCCAGTGTTCTTCCCCTG	20		
Aac10aF	*TCTCATGCTCTCTCTTCCC	19	(CT)8	267
Aac10aR	CTTAGACAACCAGATGGATCA	21		
Aac10bF	*TCTGATCCATCTGGTTGTCTAA	22	(TC)19(AC)8	152
Aac10bR	TGCATGGTGTCTAGAGTAATCC	21		
Aac11F	*ACTTGTTGCTGATACGCACG	20	(GT)6	213
Aac11R	ACCTGGGGATGATGTGTAGC	20		
Aac12F	*CTTACGCGCTGGACTAACAAG	21	(CA)14	312
Aac12R	GGCTCATTGTATTAGGGCCA	20		
Aac13F	*CCCAGCTAGACAACCCAAGA	20	(CA)5	193
Aac13R	CGCGTGGACTAACATCGAA	19		
Aac14F	*CGCACGTACACACACACAT	21		
Aac14R	TCAGCCAGTTACACTTCTGTGG	22	(CA)11	268
Aac15F	*CAAGCGCCTCCAAGGTAGAT	20		
Aac15R	GGAAAGAGAAGCAAGGAGTGG	21		

Tabela 2.1 – Sequências dos iniciadores de microssatélites identificados, incluindo o nome do iniciador, motivo de repetição e tamanhos dos fragmentos em pares de bases (pb)

Iniciador	Sequência do iniciador	pb	Motivo de repetição	Tamanho fragmento
Aac16F	*AGCCGTGAGTGAAGTGCCTT	20	(CT)7	121
Aac16R	AAGCCCAAACCTTCTTCCTCG	20		
Aac17F	*CCCTGCCTGTAGTATCGGAC	20	(GATCTT)2	156
Aac17R	TACCTCACGACCCCTTGTCTT	20		
Aac18F	*ACAGAAAGGAGCGATGGAAA	20	(CT)18	223
Aac18R	GAAAATGAACCTGGAGAAAAGC	22		
Aac19F	*AAAGGAACAACCCAAGAGGG	20	(AC)5	204
Aac19R	TGGGGAGTGGACGTAAGTGT	20		
Aac20F	*CCTTGATGGCGTGTACGAAT	20	(TC)14 (AC)14	338
Aac20R	GGCTTCTCAAACAACCTCCT	21		
Aac21F	*TAGGTTGTGGTTGGTGAGCC	20	(TG)5	396
Aac21R	GCCACTCAGCTAGGGTCAAG	20		
Aac22aF	*TGGGGCTTGACCCTATTGTA	20	(TG)6	386
Aac22aR	CTTCGAGTAACACCTCTCCACC	22		
Aac22bF	*GCTCTGTAATCTCGGCTTCCT	21	(GC)5 (AC)3 aaac (AG)17	190
Aac22bR	TCCAGTTCAAGCTCTCTCAGC	21		
Aac23F	*ATTCCCAAGGAGAGGAGAGC	20	(AAGC)3	181
Aac23R	CCGCCAACAACCTAACCTAC	20		
Aac24F	*AGCAAATCAATGGCACTCAA	20	(TC)18 (AC)10	213
Aac24R	CACCCAGCACACATGCTTAT	20		
Aac25F	*CTAGACAACCCAAGAGAGGGG	21	(CA)7	196
Aac25R	TTGGAGAGTGGATGTAGGTGC	21		
Aac26F	*GGCCAGTTGTGTTGATGAAA	20	(CA)6(CG)7(CA)11(GA)11	390
Aac26R	TTAAGCCCCTGGTGAAAACA	20		
Aac27F	*AGAAAAGGGAACCCCAACAC	20	(CT)6	339
Aac27R	ATAGCCAAGATGCCAAGACG	20		
Aac28F	*CTGCACGAAATATACACACACG	22	(AC)9	221
Aac28R	GCAAAACTCTCAAACCAGGG	20		

*Calda M13 (tgtaaacgacggccagt) (SCHUELKE, 2000) acrescentada nos iniciadores *forward* quando sintetizados.

2.2.5 Transferência dos microssatélites do tucumã-do-Amazonas em outras arecaceas

Os iniciadores caracterizados foram amplificados em outras seis espécies, com quatro amostras cada. Estas espécies foram *A. acaule* Mart., *A. jauari* Mart., *A. murumuru* Mart., *A. vulgare* Mart., *Bactris gasipaes* Kunth e *Euterpe precatoria* Mart. Para isso foram utilizados em cada uma das amostras de cada espécie a mesma reação, volume e temperatura de anelamento e extensão da PCR que foi utilizada para o tucumã-do-Amazonas no processo de caracterização. Nesta etapa foi avaliada a presença ou ausência da amplificação, assim como o intervalo do loco quando foi observado e seu número de alelos.

As quatro amostras de cada espécie foram coletadas em diferentes locais do estado do Amazonas, Brasil. *A. acaule* foi coletado no município de Manaus, na área do Tarumã-Açu (lat 02°53'22.04"S, long 60°06'12.08" W). No município de Coari, na comunidade de Santa Luzia do Buiçuzinho, foram coletadas as espécies *A. jauari* (lat 04° 00'58.00" S, long 63° 25' 22.00" W), *A. murumuru* (lat 04° 01'03.67" S, long 63° 25' 17.41" W) e *A. vulgare* (lat 02° 53'37.40" S, long 59° 58' 23.50" W). Em Manaus, na Embrapa Amazônia Ocidental, foi coletada a espécie *Bactris gasipaes* (lat 02° 53'31.00" S, long 59° 58' 21.70" W) e no INPA foi coletada a espécie *Euterpe precatoria* (lat 03°05'45.29" S, long 59° 59' 14.10" W).

2.2.6 Índices de diversidade genética

Para cada iniciador de microssatélite foi verificada a presença de alelos nulos utilizando o *software* MICROCHECKER (OOSTERHOUT et al., 2004) com um intervalo de confiança de 95 % e 10.000 interações, permitindo identificar os erros de genotipagem, ou seja, verifica a presença de alelos que não são amplificados mesmo estes existindo (alelos nulos). O programa estima os alelos nulos em cada loco, baseado nos níveis de endogamia e no efeito *Wahlund* (redução da heterozigosidade em uma população causada pela subestruturação da população), assim como nos desvios ao determinar o Equilíbrio de Hardy - Weinberg (*EHW*), o que indica que este é estimado pela frequência dos alelos.

Os parâmetros de diversidade genética, tais como: número de alelos totais (*A*), alelos privados (*AP*), heterozigosidade observada (*H_O*), heterozigosidade esperada (*H_E*), coeficiente de endogamia (*f*), e equilíbrio de Hardy - Weinberg (*EHW*), foram estimados para cada loco e em cada população individual com o programa *Genetic Data Analysis - GDA* (LEWIS; ZAYKIN, 2001).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Desenho dos microssatélites

A biblioteca genômica permitiu identificar 28 sequências enriquecidas para microssatélites de *A. aculeatum* de um total de 96 colônias, o que indica 29,2% de enriquecimento para o tucumã-do-Amazonas. Um resultado próximo a este foi observado para o melão (*Cucumis melo*), com 28% (RITSCHER et al., 2004) e resultados superiores de enriquecimento foram observados para urucum (*Bixa orellana*), com 67,9% (DEQUIGIOVANNI, 2012) e em Cataia (*Pimenta pseudocaryophyllus*) com 65,9% (MORGANTE et al., 2012). Resultado inferior a este foi observado em pupunha (*Bactris gasipaes*) com enriquecimento de apenas 1,41% (MARTÍNEZ et al., 2002). Esta informação mostra que o percentual de enriquecimento é muito variável entre espécies e que é influenciado pelos parâmetros definidos na busca por microssatélites nas sequências (DEQUIGIOVANNI, 2012).

Nestas 28 sequências foram identificados 31 pares de microssatélites, sendo que destes, 16 foram dinucleotídeos (51,62%), um tetranucleotídeo (3,23%), seis hexanucleotídeos (19,35%), seis compostos (19,35%) e dois compostos interrompidos (6,45%) (Tabela 2.1).

2.3.2 Caracterização dos locos microssatélites

Dos 31 iniciadores sintetizados, foram caracterizados 14 iniciadores. Estes foram renomeados de um (1) a 14 (Tabela 2.2). As temperaturas de anelamento para estes iniciadores variaram de 55 a 66°C, e a temperatura de extensão foi de 68°C com exceção dos locos Aac07 e Aac11, que foi 72°C.

Dentre os 14 iniciadores que apresentaram amplicons, ou seja, produtos de amplificação, dois (14%) foram monomórficos (Aac05 e Aac08) para os grupos de indivíduos estudados. Contudo, isto não impede que em futuros estudos estes iniciadores passem a ser utilizados em outros grupos de indivíduos e apresentem polimorfismo, como o caso dos iniciadores Aac11 e Aac13 (Tabela 2.2.) que mostraram-se monomórficos para uma população e polimórficos na outra população estudada. A presença ou ausência de iniciadores monomórficos é muito variável nas diferentes espécies. Por exemplo, no desenvolvimento e caracterização dos microssatélites para *Sisyrinchium micranthum* da família Iridaceae, observou-se 11% de monomorfismo num total de nove iniciadores (TACUATIÁ et al., 2012), enquanto que a espécie *Enhalus acoroides* da família Hydrocharitaceae apresentou 89% de monomorfismo num total de 36 iniciadores de microssatélites (GAO et al., 2012).

2.3.3 Índices de diversidade genética nas populações de *Astrocaryum aculeatum*

Para realizar estas análises, foram utilizados 12 iniciadores de microssatélites que apresentaram polimorfismo após a genotipagem dos acessos amostrados. Nestes iniciadores foi observada a presença de alelos nulos para dois iniciadores, sendo estes, o iniciador Aac06 nas duas populações, Manicore e Manaus, e no iniciador Aac13 na população de Manicore.

Os 12 locos polimórficos confirmaram o conteúdo de informação genética, mostrando que a população de Manaus apresentou de um a sete alelos por loco, com uma média de 3,4 alelos por loco. A heterozigosidade observada (H_O) para a população de Manaus variou de zero a 0,974, com média de 0,498 por loco. Já a heterozigosidade esperada (H_E) variou de zero a 0,824 com média de 0,467 por loco para esta população. A população de Manicoré apresentou de um a oito alelos por loco, com média de 3,7 alelos por loco. A H_O variou de zero a 0,950, com média de 0,556 por loco, e a H_E foi de zero a 0,859, com média de 0,526 por loco. Nas médias de cada população, as H_O apresentaram valores superiores às H_E , indicando que nas populações existe um elevado número de heterozigotos, o que mostra a existência de cruzamentos aleatórios com um nível baixo de endocruzamento (HARTL; CLARK, 2010). O coeficiente de endogamia ou índice de fixação (f) médio dos locos (Tabela 2.2) apresentou valores inferiores a zero e negativos, o que confirma a existência de excesso de heterozigotos e a existência de cruzamentos aleatórios. Entretanto, o iniciador Aac06 apresentou para o f valores altos e positivos em ambas as populações, mostrando excesso de plantas com alelos homozigotos, como mostra as H_E e H_O para este loco.

2.3.4 Transferência dos microssatélites de *Astrocaryum aculeatum* para outras *Areaceas*

Os iniciadores caracterizados para *A. aculeatum* foram amplificados em outras seis espécies, com quatro amostras cada. Destas seis espécies, quatro foram do mesmo gênero do tucumã-do-Amazonas, sendo estas *A. acaule* Mart., *A. jauari* Mart., *A. murumuru* Mart., *A. vulgare* Mart. Os outros dois gêneros foram *Bactris gasipaes* Kunth e *Euterpe precatoria* Mart. Os resultados mostraram uma taxa de amplificação nas seis espécies, que variou entre 50 a 93%, sendo que este valor foi determinado pela presença ou ausência da amplificação dos locos por espécie. Ou seja, observou-se 50% de amplificação para as espécies *Euterpe precatoria* e *Bactris gasipaes*, 85,7% para *A. acaule*, *A. vulgare* e *A. murumuru*, e 92,8% para *A. jauari*. Com relação ao nível de locos polimórficos, a espécie *Euterpe precatoria* apresentou um único loco (Aac11) polimórfico, ao apresentar dois alelos, e a espécie que apresentou mais locos polimórficos foi *A. jauari*, sendo estes Aac03, Aac04, Aac05, Aac07,

Aac09, Aac10, Aac12, Aac13 e Aac14, apresentando 23 alelos para estes nove locos (Tabela 2.3).

Com exceção do loco Aac08, todos os demais foram amplificados por pelo menos uma das espécies avaliadas. Foi observado também que os locos Aac01 e Aac02 apresentaram alelos monomórficos em todas as espécies.

2.4 Conclusões

Os 14 locos microssatélites desenvolvidos para a espécie *A. aculeatum* mostraram-se informativos, servindo de ferramentas para estudos em genética populacional, que desempenham um papel fundamental no aumento do conhecimento sobre a diversidade genética do germoplasma disponível de tucumã-do-Amazonas na Floresta Amazônica, permitindo auxiliar nas políticas de gestão e conservação para esta espécie no Amazonas. Este conjunto de marcadores forneceu suporte inestimável para estudos de diversidade genética e análise do sistema de acasalamento para auxiliar no melhoramento genético e conservação do tucumã-do-Amazonas.

Tabela 2.2 - Caracterização de locos de microsatélite desenvolvidos para *Astrocaryum aculeatum* em duas populações do estado de Amazonas

Iniciador	Novo nome do Iniciador	Acesso no Genbank	Motivo de repetição	Sequencias dos iniciadores (5'-3')	T_a (°C)	Tamanho fragmento (bp)	Manaus ^a (n=20)				Manicoré ^b (n=20)			
							A	H_E	H_o	f	A	H_E	H_o	f
Aac01F	Aac01F	GF111927	(ATCACT)2	F:CACATGGTTCCTCCTCGTTC	60	350-380	2	0.102	0.105	-0.029	1	0	0	
Aac01R	Aac01R			R:GCGAAAGGGTATAGTCAGCG										
Aac02F	Aac02F	GF111928	(GCCATG)2	F:CGATTGAGTCCGATGTG	60	300-360	2	0.309	0.368	-0.200	2	0.481	0.75	-0.583
Aac02R	Aac02R			R:GCAGTTGTGTGCTGGTCT										
Aac03F	Aac03F	GF111929	(TCCTAC)2	F:GCCTCCTTTAGTTCCTGCAC	60	155-185	2	0.512*	0.947	-0.895	3	0.538*	0.944	-0.795
Aac03R	Aac03R			R:AGCATCGGACTTTCCAGGT										
Aac05F	Aac04F	GF111930	(GT)7(GA)16	F:GCATTGTCATCTGCAACCAC	60	230-260	6	0.824	0.75	0.092	6	0.794	0.8	-0.008
Aac05R	Aac04R			R:GCAGGGGCCATAAATCATAA										
Aac07F	Aac05F	GF111931	(TACGCT)2	F:GTCCAATTCAGCTCGGCTT	62	414	1	—	—	—	1	—	—	—
Aac07R	Aac05R			R:TTATGCAATGGTGGTGTGT										
Aac10bF	Aac06F	GF111932	(TC)19(AC)8	F:TCTGATCCATCTGGTTGTCTAA	64	150-210	5	0.522*	0.05	0.906	8	0.859*	0	1.000
Aac10bR	Aac06R			R:TGCATGGTGCTAGAGTAATCC										
Aac11F	Aac07F	GF111933	(GT)6	F:ACTTGTGTGATACGCACG	59	220-240	3	0.655	0.60	0.086	3	0.643	0.824	-0.291
Aac11R	Aac07R			R:ACCTGGGGATGATGTGTAGC										
Aac14F	Aac08F	GF111934	(CA)11	F:CGCACGTACACACACACAT	57	263	1	—	—	—	1	—	—	—
Aac14R	Aac08R			R:TCAGCCAGTTACACTTCTGTGG										
Aac15F	Aac09F	GF111935	(CT)18	F:CAAGCGCCTCCAAGGTAGAT	66	320-370	7	0.674	0.556	0.177	7	0.762	0.65	0.158
Aac15R	Aac09R			R:GGAAAGAGAAGCAAGGAGTGG										
Aac16F	Aac10F	GF111936	(CT)7	F:AGCCGTGAGTGAAGTCTTT	60	130-146	2	0.512*	0.95	-0.900	2	0.501*	0.85	-0.727
Aac16R	Aac10R			R:AAGCCCAAACCTTCTCCTCG										
Aac19F	Aac11F	GF111937	(AC)5	F:AAAGGAACAACCCAAGAGGG	60	220-246	2	0.142	0.15	-0.056	1	—	—	—
Aac19R	Aac11R			R:TGGGGAGTGGACGTAAGTGT										
Aac22bF	Aac12F	GF111938	(GC)5 (AC)3 aaac (AG)17	F:GCTCTGTAATCTCGGCTTCT	60	185-200	5	0.688	0.974	-0.391	3	0.621*	0.95	-0.553
Aac22bR	Aac12R			R:TCCAGTTCAAGCTCTCTCAGC										
Aac25F	Aac13F	GF111939	(CA)7	F:CTAGACAACCCAAGAGAGGGG	60	200-220	1	—	—	—	3	0.347*	0.15	0.575
Aac25R	Aac13R			R:TTGGAGAGTGGATGTAGGTGC										
Aac26F	Aac14F	GF111940	(CA)6(CG)7(C A)11(GA)11	F:GGCCAGTTGTGTTGATGAAA	55	395-410	4	0.668	0.556	0.173	5	0.764	0.75	0.019
Aac26R	Aac14R			R:TTAAGCCCTGGTGAACA										
Media							3,417	0.467	0.498	-0.068	3,667	0.526	0.556	-0.057

*Desvio do Equilíbrio de Hardy - Weinberg utilizando teste exato de Fisher ($P < 0.000416$, depois da correção de Bonferroni). Temperatura de anelamento (T_a); número de indivíduos (N); número de alelos por locus (A); heterozigidade esperada (H_E); heterozigidade observada (H_o); ^aManaus, Amazonas, Brasil (lat 03°06'07.17"S, long 59°58'53.10"N); ^bManicoré, Amazonas, Brasil (lat 05°49'30.05"S, long 61°16'16.12"N).

Tabela 2.3 - Transferência de 14 iniciadores de microssatélites desenvolvidas para *Astrocaryum aculeatum* em outras seis espécies da família Arecaceae. Incluindo a extensão do iniciador em pares de base (pb) e o número de alelos (A) por espécie

Iniciador ^a	<i>A. acaule</i> Mart. ^b		<i>A. jauari</i> Mart. ^c		<i>A. murumuru</i> Mart. ^d		<i>A. vulgare</i> Mart. ^e		<i>Bactris gasipaes</i> Kunth. ^f		<i>Euterpe precatoria</i> Mart. ^g	
	Ext. alelo (pb)	A	Ext. alelo (pb)	A	Ext. alelo (pb)	A	Ext. alelo (pb)	A	Ext. alelo (pb)	A	Ext. alelo (pb)	A
Aac01	338	1	338	1	338	1	338	1	338	1	338	1
Aac02	291	1	291	1	291	1	291	1	291	1	291	1
Aac03	145	1	127-147	2	145	1	145	1	145	1	145	1
Aac04	223	1	197-207	2	207-227	4	187-207	2	NA	NA	187	1
Aac05	392-457	2	322-362	3	453	1	392-457	2	NA	NA	NA	NA
Aac06	154	1	134	1	142-162	5	142-162	2	NA	NA	NA	NA
Aac07	207-217	2	207-217	3	212-227	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Aac08	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Aac09	NA	NA	322-327	2	329	1	323	1	NA	NA	NA	NA
Aac10	112-128	2	97-117	2	108-132	2	114	1	114	1	112	1
Aac11	205	1	205	1	205	1	205	1	192-222	2	202-228	2
Aac12	152-202	2	175-182	5	158-178	4	162-178	2	147-173	3	151	1
Aac13	182-212	2	182-212	2	182-206	2	182-212	2	192-222	3	NA	NA
Aac14	372-382	2	382-392	2	NA	NA	382-398	2	NA	NA	NA	NA

^aPCR – Temperatura de anelamento na Tabela 2.2. N = 4 para todas as espécies. ^bManaus, Amazonas, Brasil (lat 02°53'22.04" S, long 60°06'12.08" W), *Tarumã-açu*; ^cCoari, Amazonas, Brasil (lat 04° 00'58.00" S, long 63° 25' 22.00" W), *Santa Luzia do Buiçuzinho*; ^dCoari, Amazonas, Brasil (lat 04° 01'03.67" S, long 63° 25' 17.41" W), *Santa Luzia do Buiçuzinho*; ^eManaus, Amazonas, Brasil (lat 02° 53'37.40" S, long 59° 58' 23.50" W), *Embrapa Amazônia Ocidental*; ^fManaus, Amazonas, Brasil (lat 02° 53'31.00" S, long 59° 58' 21.70" W), *INPA*; ^gManaus, Amazonas, Brasil (lat 03° 05'45.29" S, long 59° 59' 14.10" W), NA = no amplificou.

Referências

BILLOTTE, N.; LAGODA, P.J.L.; RISTERUCCI, A.M.; BAURENS, F.C. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, Paris, v. 54, p. 277–288, Aug. 1999.

DAVEY, J.W.; HOHENLOHE, P.A.; ETTER, P.D.; BOONE, J.Q.; CATCHEN, J.M.; BLAXTER, M.L. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. **Nature Reviews: Genetics**, London, v. 12, p. 499-510, July 2011.

DEQUIGIOVANNI, G. **Desenvolvimento de locos de microssatélite para a caracterização da diversidade genética de acessos de urucum (*Bixa orellana* L.)**. 2013. 73p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

DIVA-GIS. 2012. **User Manual, version 7.5** [en línea]. Disponível em: <http://www.diva-gis.org/docs/DIVA-GIS_manual_7.pdf>. Acesso em: 01 jun. 2013.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13–15, Jan. 1990.

EISERHARDT, W.L.; SVENNING, J-C.; KISSLING, W.D.; BALSLEV, H. Geographical ecology of the palms (Arecaceae): determinants of diversity and distributions across spatial scales. **Annals of Botany**, Oxford, v. 108, p. 1391–1416, June 2011.

FALEIRO, F.G. **Marcadores genéticos - moleculares aplicados a programas de conservação e uso dos recursos genéticos**. Planaltina-DF: EMBRAPA Cerrados, 2007. 102 p.

FAO. **Especies Forestales Productoras de Frutas y Otros Alimentos, 3. Ejemplos de América Latina**. Roma: Estudio FAO Montes 44/3. 1987. 265p. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/015/an785s/an785s00.pdf>>. Acesso em: 14 Ago. 2013.

GAO, H.; JIANG, K.; GENG, Y.; CHEN, X-Y. Development of microsatellite primers of the largest seagrass, *Enhalus acoroides* (Hydrocharitaceae). **American Journal of Botany**, St. Louis, v.99, p. e99–e101. Mar. 2012.

GOVAERTS, R.; DRANSFIELD, J. **World checklist of palms**. Richmond: Royal Botanic Gardens Kew, 2005. 236p.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, p. 95–98. Jan. 1999.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Princípios de genética de populações**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 660p.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis: computer programe for the analyse of allelic data**. Version 1.0, 2001. Disponível em:<
<http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php> >. Acesso em: 20 jun. 2010.

LLERAS, E.; GIACOMETTI, D.C.; CORADIN, L. Áreas críticas de distribución de palmas en las Américas para colecta, evaluación y conservación. In: FAO. **Informe de la reunión de consulta sobre palmeras poco utilizadas de América Tropical**. Turrialba: FAO, 1983. p. 67-101.

LOPES, M.T.G.; MACÊDO, J.L.V.D.; LOPES, R.; LEEUWEN, J.V.; RAMOS, S.L.F.; BERNARDES. Domestication and breeding of the Tucum Palm. In: BORÉM, A.; LOPES, M.T.G.; CLEMENT, C.R.; NODA, H. (Eds). **Domestication and breeding: Amazonian species**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2012 chap. 20, p. 421-436.

MARTÍNEZ, A.K.; GAITÁN-SOLIS, E.; DUQUE, M.C.; BERNAL, R.; TOHME, J. Microsatellite loci in *Bactris gasipaes* (Arecaceae): their isolation and characterization. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 2, p. 408-410, Oct. 2002.

MARTINS, W.S.; SOARES-LUCAS, D.C.; NEVES, F.S.; BERTIOLI, D.J. WebSat - A web software for microsatellite marker development marker development. **Bioinformation**, Chennai, v. 3, n. 6, p. 282-283. Jan. 2009.

MIRANDA, I.P.A.; RABELO, A.; BUENO, C.R.; BARBOSA, E.M.; RIBEIRO, M.N.S. **Frutos de palmeiras da Amazônia**. Manaus: MCT/INPA, 2001. 120p.

MORGANTE, P.G.; SEBASTIÃO, I.; SILVEIRA, L.E.D.; MORI, G.M.; CONTE, M.; COFFANI-NUNES, J.V. Development of microsatellite markers for *Pimenta pseudocaryophyllus* (Myrtaceae), a wild south american species. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 99, n.11, p. 434–436, Nov. 2012.

OOSTERHOUT, C.V; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.4, p. 535–538, June 2004.

OUBORG, N.J.; PERTOLDI, C.; LOESCHCKE, V.; BIJLSMA, R.; HEDRICK, P.W. Conservation genetics in transition to conservation genomics. **Trends in Genetics**, Oxford, v. 26, p. 177–187, Apr. 2010.

RAMOS, S.L.F.; MACÊDO, J.L.V. de; MARTINS, C.C.; LOPES, R.; LOPES, M.T.G. Tratamentos pré-germinativos e procedência de sementes do tucumã-do-Amazonas para a produção de mudas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, p. 962-969, Sept. 2011a.

RAMOS, S.L.F.; LOPES, M.T.G.; LOPES, R.; CUNHA, R.N.V. da; MACÊDO, J.L.V. de; CONTIM, L.A.S.; CLEMENT, C.R.; RODRIGUES, D.P.; BERNARDES, L.G. Determination of the mating system of Tucumã palm using microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 11, p. 181–185, June 2011b.

RITSCHHEL, P.S.; LINS, T.C.L.; TRISTAN, R.L.; BUSO, G.S.C.; FERREIRA, M.E. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). **BMC Plant Biology**, London, v. 4, p. 1-14, May 2004.

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

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, New York, v.18, p. 233–234, Feb. 2000.

SOSNOWSKA, J.; BALSLEV, H. American palm ethnomedicine: A meta-analysis. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, London, v. 5, p. 43-53, Dec. 2009.

SOUZA, A.G.C.; SOUSA, N.R.; SILVA, S.E.L.; NUNES, C.D.M.; CANTO, A.C.; CRUZ, L.A.A. **Fruteiras da Amazônia**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental/Embrapa - Serviço de Produção de Informação, 1996. 204p.

TACUATIÁ, L.O.; CIDADE, F.W.; SOUZA, A. P.; SOUZA-CHIES, T.T. Development and characterization of nine microsatellite loci for *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae). **American Journal of Botany**, St. Louis, v.99, p. e402–e404. Oct. 2012.

UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B.C.; REMM, M.; ROZEN, S.G. Primer3 - new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research, Oxford**, v.40, p. e115, Aug. 2012.

3 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE TUCUMÃ-DO-AMAZONAS (*Astrocaryum aculeatum*) UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES, NO ESTADO DO AMAZONAS

Resumo

Astrocaryum aculeatum, pertencente à família Arecaceae, é adaptada a ecossistemas de terra firme que sofreram alguma ação antrópica e tem ocorrência na Amazônia Ocidental e Central brasileira. Seu fruto é muito apreciado na região amazônica, cuja polpa é consumida na forma fresca. Sua produção é realizada quase exclusivamente pelos agricultores extrativistas, pelo fato de não existir material selecionado para o estabelecimento dos plantios. O conhecimento dos parâmetros de diversidade e estrutura genética de plantas superiores como doadoras de progênes nas populações naturais é fundamental para o estabelecimento de estratégias adequadas no uso deste recurso genético, para aumentar a eficiência da domesticação e seleção nas etapas de um programa de melhoramento genético. Sob esta necessidade, o objetivo foi revelar a diversidade e estrutura genética de genótipos superiores selecionados e conservados em populações naturais de tucumã-do-Amazonas no estado do Amazonas, utilizando microssatélites. Foram coletadas 218 plantas distribuídas em 15 populações, localizadas em 14 municípios do estado de Amazonas. Foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) 12 locos de microssatélite. As genotipagens obtidas por eletroforese capilar no Analisador automático de DNA ABI-3130XL *Genetic Analyzer* foram analisadas pelo programa GENEMAPPER – v. 4.0. Foram estimados parâmetros de diversidade e estrutura genética entre as populações. O número de alelos por loco indicou 101 alelos, com média de 10,1 alelos por loco. As médias das heterozigosidades observadas (H_O) foram superiores às esperadas (H_E) ao nível de população ($H_O=0,639$, $H_E=0,557$) e locos ($H_O=0,639$; $H_E=0,594$). O coeficiente de endogamia (f) apresentou valores negativos nos locos e populações. Os baixos valores de F_{ST} (0,07) e os resultados da AMOVA mostraram uma moderada estrutura populacional. O Teste de Mantel indicou correlação genética positiva entre as populações, independente das distâncias geográficas ($r=0,32$; $p=0,07$), sugerindo que as populações de *A. aculeatum* são separadas pela vicariância que existe entre as populações. A análise Bayesiana indicou três possíveis agrupamentos ($K=3$, $K=4$ ou $K=5$). O mais adequado foi $k=4$, o que foi confirmado pelas análises de PCoA e agrupamento. Os índices de diversidade genética confirmaram a estratégia reprodutiva por alogamia da espécie, com níveis elevados de heterozigotos nas populações. Os resultados sugerem também que as populações de tucumã-do-Amazonas teriam iniciado o processo de formação das subpopulações há pouco tempo apresentando três momentos históricos, antes e após o início do desmatamento e no momento atual, sugestão que pode ser confirmada pelos agrupamentos obtidos na análise Bayesiana e PCoA. Com relação à conservação da espécie, esta deve ser realizada ao nível das bacias hidrográficas, direcionando políticas de manejo nestas bacias hidrográficas da Amazônia. Em conclusão, a análise molecular das populações de *A. aculeatum* mostrou que existe alta diversidade genética dentro de populações, com uma estrutura genética desta espécie é moderada e possíveis eventos históricos.

Palavras-chave: Amazônia; Arecaceae; *Astrocaryum aculeatum*; Microssatélites; Tucumã-do-Amazonas; Diversidade genética; Estrutura genética

Abstract

Astrocaryum aculeatum belongs to the family Arecaceae, and is adapted to non-flooded forests (“terra firme”) ecosystems that have suffered some human action. It occurs in the Western and Central Brazilian Amazon. Its fruit is widely appreciated in the Amazon region and its pulp is consumed fresh. It is produced almost exclusively by extractive farmers, due to the fact that there is no selected material for the establishment of plantations. The knowledge of the genetic diversity and structure parameters of higher plants as donors of progenies in natural populations is fundamental in establishing adequate strategies in the use of this genetic resource, to increase the efficiency of domestication and selection in the steps of a breeding program. Under this need, the objective was to reveal the genetic diversity and structure of selected and preserved superior genotypes in natural populations of tucum palm in the State of Amazon, using microsatellites. We collected 218 plants distributed in 15 populations located in 14 municipalities of the state of Amazonas. We amplified by polymerase chain reaction (PCR) 12 microsatellite loci. The genotyping was obtained from capillary electrophoresis on automatic DNA analyzer ABI - 3130xl *Genetic Analyzer* in the GENEMAPPER – v.4.0 program. Parameters of diversity and genetic structure among populations were analyzed. The number of alleles per locus showed 101 alleles, with an average of 10.1 alleles per locus. The averages of the observed heterozygosities were higher than the expected heterozygosities at the population ($H_O=0.6390$; $H_E=0.557$) and loci ($H_O=0.6390$; $H_E=0.5939$) levels. The inbreeding coefficient (f) showed negative values for loci and populations. The low values of F_{ST} (0.07) and AMOVA results showed a moderate population structure. The Mantel test indicated a positive genetic correlation among populations, regardless of the geographical distances ($r=0.32$; $p=0.07$), suggesting that populations of *A. aculeatum* are separated only by vicariance that exists between populations. The Bayesian analysis indicated three possible clusters ($K=3$, $K=4$ ou $K=5$). The most suitable was $k=4$, confirmed by the groups formed in the PCoA and cluster analysis. The genetic diversity indices confirmed the outcrossing reproductive strategy of the species with high levels of heterozygotes in the populations. Results also suggest that populations of tucum palm would have started the process of formation of subpopulations a short time ago, presenting three historical moments, before and after the onset of deforestation and at present, a suggestion that can be confirmed by the groups obtained in Bayesian analysis and PCoA. In relation to the species conservation, it should be performed at the level of watersheds, directing management policies in these river basins of the Amazon. In conclusion, the molecular analysis of *A. aculeatum* populations showed high genetic diversity within populations, with a moderate genetic structure for this species and possible historical events.

Keywords: Amazon; Arecaceae; *Astrocaryum aculeatum*; Microsatellites; Tucum palm; Genetic diversity; Genetic structure

3.1 Introdução

O tucumã-do-Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) é uma palmeira Amazônica pertencente à família Arecaceae, adaptada a ecossistemas de terra firme e, mais comumente, em áreas desmatadas ou que sofreram alguma ação antrópica (MIRANDA et al., 2001; RAMOS et al., 2011b). Tem ocorrência circunscrita à Amazônia Ocidental e Central brasileira, especificamente nos estados do Acre, Mato Grosso, Rondônia, Roraima, parte do

Pará (LOPES et al., 2012) e Amazonas, sendo este último seu provável centro de diversidade genética mais importante (LLERAS; GIACOMETTI; CORADIN, 1983). O fruto do tucumã é muito apreciado pela população da região amazônica que consome a polpa na forma fresca. Das sementes e polpa podem ser extraídos óleos para uso na alimentação humana e indústria de cosméticos, sendo que o endocarpo é usado no artesanato (RAMOS et al., 2011b; LOPES et al., 2012). Porém, a produção disponível é quase exclusivamente pelas explorações extrativistas, apresentando à população ofertas irregulares tanto em quantidade como em qualidade. O aumento da demanda no mercado e o bom preço pago pelos frutos têm despertado interesse no plantio desta espécie pelos agricultores da região de Manaus, no estado do Amazonas, mas não existe disponibilidade de material selecionado para o estabelecimento dos plantios.

As populações naturais espontâneas apresentam grande variabilidade genética disponível para características como altura da planta, produção e qualidade dos frutos, em tamanho, rendimento de polpa, sabor, conteúdo de fibra e óleo (SCHROTH et al., 2004; RAMOS et al., 2011a). A identificação e seleção fenotípica dos indivíduos superiores nas populações naturais de tucumã-do-Amazonas permitiria aumentar a frequência dos genes favoráveis, alterando a média das características de interesse das populações, o que resulta em ganhos de produtividade, melhoria de qualidade de frutos e crescimento com menor altura nas plantas (LOPES et al., 2012). Entretanto, além destas informações morfoagronômicas, o emprego de marcadores moleculares dominantes ou codominantes, que se caracterizam por possuir uma base genética que os identifica e os diferencia uns dos outros, pode auxiliar no estudo do tucumã-do-Amazonas, permitindo medir o grau de polimorfismo em uma ou mais populações de indivíduos, dando resposta a questões importantes em estudos de genética populacional e abordagens ecológicas e evolutivas (DAVEY et al., 2011). Um destes marcadores co-dominantes importantes no contexto da conservação genética são os microssatélites ou Sequências Simples Repetidas (SSR), que utilizados em populações naturais permitem estimar a variação genética, estrutura populacional e fluxo gênico (OUBORG et al., 2010), considerando que a identificação de sequências repetitivas, distribuídas arbitrariamente em alta frequência, levam a formação de locos genéticos polimórficos (DAVEY et al., 2011).

O conhecimento das características agro-morfológicas, assim como dos parâmetros de diversidade e estrutura genética interpopulacional e intrapopulacional de populações naturais de tucumã (*A. aculeatum*) são fundamentais para o estabelecimento de estratégias adequadas no uso deste recurso genético, permitindo direcionar possíveis cruzamentos, aumentar a

eficiência da domesticação e seleção nas etapas de um programa de melhoramento genético da espécie. Atualmente, os esforços para fornecer subsídios à domesticação de *A. aculeatum* têm sido empreendidos, mas não existem informações disponíveis que possam indicar a superioridade de plantas ou populações naturais espontâneas para a produção e qualidade dos frutos ou alguma característica de interesse. Esta falta de subsídios, através de pouca ou nenhuma pesquisa é também manifestada na literatura para *A. aculeatum* e para diversas espécies frutíferas nativas da Amazônia que apresentam algum grau de domesticação (CLEMENT, 2001). É também importante ampliar o conhecimento sobre essas espécies porque a floresta Amazônica Brasileira experimentou eventos climáticos extremos induzidos pelos fenômenos *El Niño*, associados com condições mais secas, e *La Niña*, associada com condições mais úmidas (SENA et al., 2012). Existe ainda muito a ser feito na Amazônia, considerando inclusive que estas plantas nativas presentes colocam a Amazônia como um dos importantes centros de diversidade genética de cultivos (CLEMENT et al., 2010).

Assim, procurando preencher informações que possam indicar a superioridade de populações naturais espontâneas para a produção e qualidade dos frutos, e no processo de domesticação, a Embrapa Amazônia Ocidental através do projeto “Pesquisa, desenvolvimento e inovação em palmáceas para a produção de óleo e aproveitamento econômico de co-produtos e resíduos – PROPALMA”, identificou genótipos superiores do tucumã-do-Amazonas, que foram selecionados nas populações naturais, baseados na produção e qualidade dos frutos. Esta iniciativa permitiu criar coleções de genótipos superiores, que atualmente são conservados *in situ* (*on farm*) e *ex situ*. A coleção *ex situ* foi obtida através das progênies destes genótipos superiores, e atualmente estão em fase de plântulas. A coleção de acessos *ex situ* de *A. aculeatum* tem como intuito fornecer futuramente material para propagação. Entretanto, estes acessos de germoplasma são apenas uma amostra da variabilidade genética da espécie em interesse, fora do seu habitat natural (NASS, 2001).

Sob esta necessidade, de conhecer a diversidade dos genótipos de *A. aculeatum* selecionados como doadores das progênies nas populações naturais espontâneas, que serão depositados no banco de germoplasma da espécie, esta pesquisa teve como objetivo identificar a diversidade e estrutura genética de genótipos superiores selecionados e conservados em populações naturais de tucumã-do-Amazonas (*A. aculeatum*), no estado do Amazonas, utilizando marcadores microssatélites. Este estudo pretendeu responder as seguintes questões: a) qual é o nível de variabilidade genética presente nas populações naturais avaliadas de tucumã-do-Amazonas?; b) de que forma esta diversidade encontra-se estruturada?; c) será que está ocorrendo um isolamento por distância entre as populações?. A

resposta a essas questões irá possibilitar a melhoria e eficiência no programa de melhoramento genético do tucumã-do-Amazonas. Considerando que esta espécie ainda não foi domesticada, este estudo teve como meta contribuir para o manejo, uso e conservação dos recursos genéticos desta espécie de forma *in situ* e *ex situ*.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Área de estudo, local de amostragem e identificação das plantas

Este estudo foi realizado no estado de Amazonas, em 14 municípios localizados em diferentes bacias hidrográficas. Estas bacias são em sua maioria o único meio de transporte dos diferentes produtos para consumo, assim como para as pessoas que moram nestas áreas. Observa-se também que a produção de produtos agrícolas que incluem o tucumã-do-Amazonas, coletados por agricultores extrativistas das florestas amazônicas é comercializada entre estas populações, e na grande maioria dos casos estes utilizam o transporte fluvial para este fim, transportando material genético para outras áreas da Amazônia.

Os locais de amostragem foram definidos pela Embrapa Amazônia Ocidental através do projeto “Pesquisa, desenvolvimento e inovação em palmáceas para a produção de óleo e aproveitamento econômico de co-produtos e resíduos – PROPALMA” (Embrapa - Propalma). Este identificou os locais de amostragem através da informação verbal nas diferentes Secretarias do Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas (IDAM), órgão do Governo que apresenta uma sede em cada município do estado do Amazonas. Estes informaram os locais e agricultores que apresentam maior produção extrativista de frutos de tucumã-do-Amazonas (*A. aculeatum*) e que fazem parte do fornecimento deste produto para o mercado de Manaus, capital do estado de Amazonas. Foram identificados 14 municípios, tendo em consideração as distâncias e fluxo de transporte fluvial a estes locais (Figura 3.1A; Tabela 3.1). Os municípios selecionados foram Borba, Humaitá, Iranduba, Itacoatiara, Manaquiri, Manaus, Manicoré, Maués, Nova Olinda do Norte, Novo Aripuanã, Presidente Figueiredo, São Sebastião do Uatumã, Silves e Urucará.

A Embrapa - Propalma identificou as melhores plantas nestas populações naturais de *A. aculeatum* com base nas propriedades organoléptica do fruto (sabor, cor e tamanho) principalmente ou por alguma característica morfológica da planta, que a diferencia das demais. Estas plantas identificadas e selecionadas foram denominadas de matrizes. Estas matrizes foram registradas através de uma marcação e identificação *in situ* (Figura 3.1B).

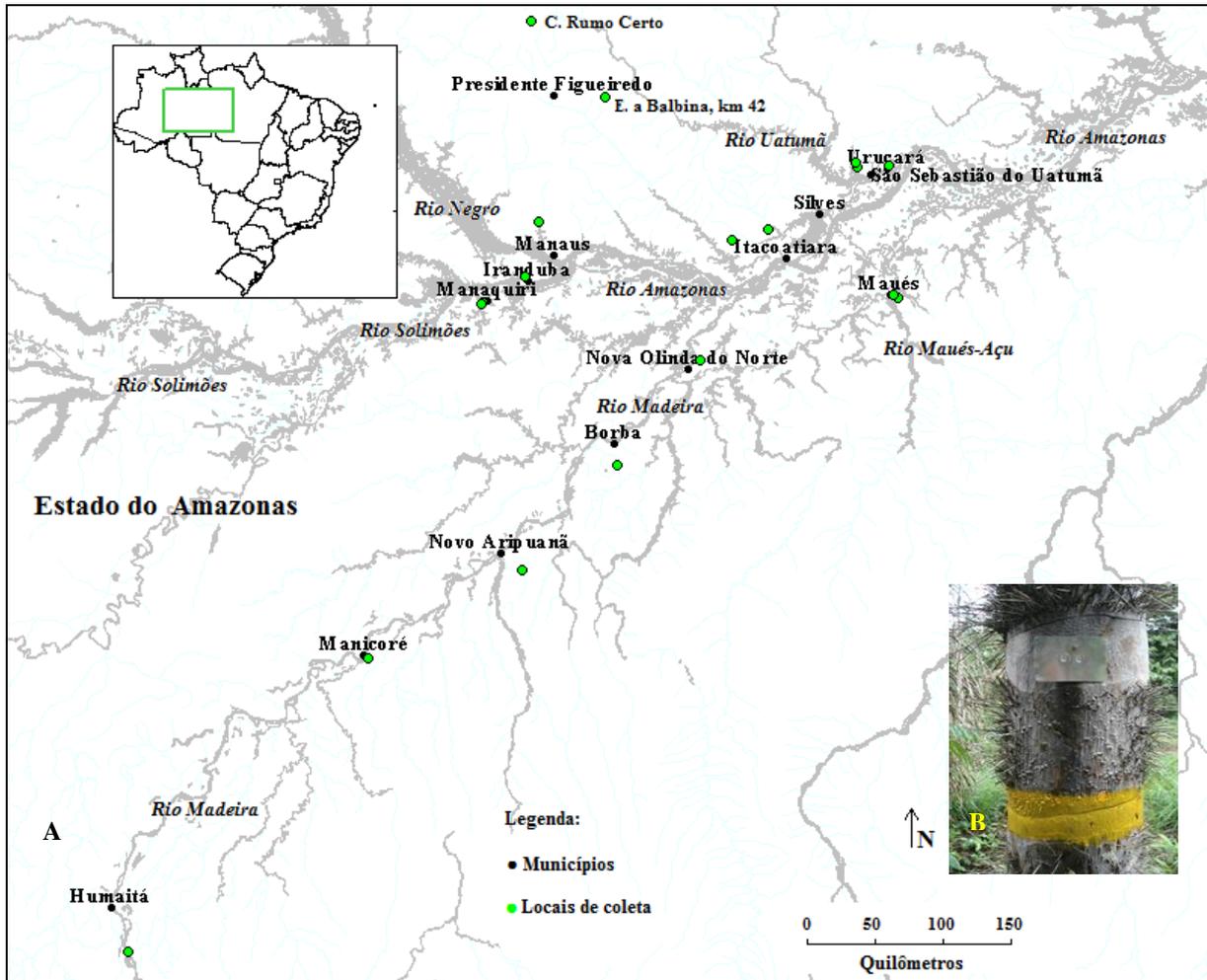


Figura 3.1 - Locais de coleta da espécie *Astrocaryum aculeatum*, em áreas de produtores extrativistas. A) Totalizando 15 populações, localizadas em 14 municípios do estado de Amazonas. Mapa criado por S.L.F. Ramos, utilizando o programa DIVA-GIS v. 7.5 (DIVA-GIS, 2012). B) Sistema de registro - marcação das plantas superiores (matrizes) para sua identificação *In Situ*. Autor: S.L.F. Ramos (2011)

Tabela 3.1 – Identificação precisa dos locais de coleta realizadas nas 15 populações de *Astrocaryum aculeatum*, localizadas em 14 municípios do estado do Amazonas

MUNICÍPIO	PROPRIEDADE	PONTOS DE REFERÊNCIA	AFLUENTES DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS	BACIAS HIDROGRÁFICAS	NÚMERO MATRIZES	PROPRIETARIO(A)/ COMUNITARIO	LA.	LO.
Humaitá	Comunidade Barro Vermelho	Igarapé do Araçá	Igarapé do Araçá	Rio Madeira	1 a 15	Dimas B. Nogueira	-7.80	-62.90
Manicoré	Sítio Canapiri	Estrada do Alonso, km 1,5		Rio Madeira	1 a 15	Mario R. L. de Freitas	-5.83	-61.27
Novo Aripuanã	Sítio Francisco	Estrada NAP 01, km 21	Rio Ariáú	Rio Madeira	1 a 15	Francisco da S. Alves	-5.23	-60.23
Borba	Fazenda C.M.	Estrada Borba - Mapia, Km. 18		Rio Madeira	1 a 15	Geraldo M. Linhares	-4.53	-59.58
Nova Olinda do Norte	Sítio Tucuxi	Estrada vicinal, PA Paquequer, km 12		Rio Madeira	1 a 15	Alaumar D. Gomes	-3.82	-59.02
Manaquiri	Sítio Boa Vista	Comunidade Bom Intento		Rio Solimões	1 a 11	Raimundo F. da Silva	-3.43	-60.49
Manaquiri	Fazenda Sebastiana	Comunidade Bom Intento		Rio Solimões	12 a 15	Angela G. de Lima	-3.44	-60.50
Irاندuba	Sítio São João Batista	Comunidade lago do Santo Antonio	Lago de Santo Antonio	Rio Solimões	1 a 15	Manoel F. S. da Silva	-3.26	-60.21
Manaus	Sítio Najatuba	Igarapé tarumã-açu	Igarapé Tarumã-açu	Rio Negro	1 a 15	Jeferson L. V. de Macêdo	-2.89	-60.12
Itacoatiara	Agropecuária Aruanã	Estrada AM 010, km 213		Rio Amazonas	1 a 15	Sergio Vergueiro	-3.01	-58.81
Urucará	Sítio Laranjal	Estrada Urucará-Manari, km 2		Rio Amazonas	1 a 8	Teresa G. de Andrade	-2.51	-57.74
Urucará	Sítio Espelho da Lua	Estrada Urucará-Manari, km 2		Rio Amazonas	9 a 15	Manoel J. P. Batista	-2.51	-57.74
Silves	Comunidade do Livramento	Comunidade do Livramento	Rio Aneba	Rio Urubu	1 a 15	José de M. O. Souza	-2.94	-58.56
Maués	Sítio São Francisco - Guaraná	Estrada dos Moraes, km 2		Rio Maués-Açu	1 a 8	José R. C. Ribeiro	-3.40	-57.68
Maués	Sítio São José	Estrada Maués Mirim, km 2		Rio Maués-Açu	9 a 15	José L. Rodrigues	-3.38	-57.71
Presidente Figueiredo	Sítio Maynara	Estrada da Balbina, km 42		Rio Uatumã	1 a 15	Valdomiro G. da Silva	-2.05	-59.67
Presidente Figueiredo	Sítio São Francisco	Comunidade Rumo Certo	Lago de balbina	Rio Uatumã	1 a 15	Antonio V. P. de Souza	-1.54	-60.17
São Sebastião do Uatumã	Sítio Bom Socorro	Comunidade Santa Etelvina (Bacabal)	Rio Maripa	Rio Uatumã	1 a 7	Claudio S. de Aragão	-2.52	-57.96
São Sebastião do Uatumã	Sítio São Sebastião	Comunidade Santa Etelvina (Bacabal)	Rio Maripa	Rio Uatumã	8 a 15	Sebastião M. Barroso	-2.49	-57.97

LA= Latitude Sul, LO=Longitude Oeste. As LA e LO são apresentadas em graus decimais.

Em cada um dos 14 municípios foram identificadas e selecionadas cerca de 15 plantas matrizes. Foi, portanto, definida em média uma população de 15 plantas matrizes para cada município. Porém, para o município de Presidente Figueiredo foi selecionada uma população a mais, devido ao fato de que uma das populações deste município se encontra na cabeceira do rio Uatumã, hoje chamada de lago de Balbina após a barragem construída na cabeceira do rio Uatumã, o que poderia indicar um isolamento e adaptação evolutiva desta população. A outra população do mesmo município se encontra na estrada Balbina km 42. No total, portanto, foram identificadas 15 populações, incluindo um total de 218 amostras de plantas selecionadas.

De todas as matrizes nas populações foi coletado um folíolo, o qual foi armazenado em um saco plástico tipo *zip lock* previamente identificado, contendo sílica gel, até que pudesse ser transportado e conservado a -20°C no Laboratório Temático de Biologia Molecular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LTBM - INPA). Também foi registrada a posição geográfica de cada uma das matrizes por meio do equipamento GPS.

3.2.2 Extração e quantificação do DNA genômico de *Astrocaryum aculeatum*.

O DNA total foi extraído de acordo com o protocolo do detergente catiônico CTAB 2X (Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide) descrito por Doyle e Doyle (1990). De cada um dos folíolos coletados foi retirado 100 mg de tecido foliar, fragmentados em pedaços bem pequenos, e colocados em um gral de porcelana, onde foi adicionado 800 μL de detergente de extração CTAB 2X, e foram macerados com auxílio de um bastão de porcelana. O produto resultante da maceração de cada uma das amostras foi depositado em tubo *Eppendorf* de 1,5 mL de capacidade, previamente identificado. Em seguida, em cada amostra se acrescentaram 2 μL de 2- β -mercaptoetanol 1% e estas foram colocadas em banho-maria a uma temperatura de 60°C , durante 30 minutos, sendo homogeneizado a cada 10 minutos. Em seguida, foram colocadas para esfriar e, logo após, foi adicionado 600 μL de Clorofórmio com Álcool Isoamílico, na proporção 24:1 (CIA). Depois, os tubos foram centrifugados a uma velocidade de 14.000 rpm por 12 minutos. Posteriormente, foi pipetada toda a fase aquosa de cada uma das amostras, e transferida para um novo microtubo de 1,5 mL. Nesse tubo foi adicionado 400 μL de Isopropanol gelado (-20°C) para permitir a precipitação do DNA. O material foi incubado por 12 horas (*overnight*) a -20°C . Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 7.500 rpm por 10 minutos, permitindo identificar o *pellet* no fundo do tubo. Logo foi eliminado o Isopropanol. Na sequência se acrescentou por duas vezes 1000 μL de etanol absoluto a 70% no *pellet* de cada amostra por 10 minutos. Logo, se acrescentou uma

única vez 1000 μL de etanol absoluto a 100% por três minutos, retirando-se em seguida o máximo possível deste etanol. Em seguida, os tubos *Eppendorf* com o *pellet* foram colocados a secar na bancada a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 75 μL de solução tampão TE (Tris-HCl e EDTA) acrescido de RNase na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As amostras foram incubadas por duas horas a 37°C e vortexadas de 30 em 30 minutos para a digestão do RNase. O material final foi armazenado a -20 °C.

A quantificação do DNA genômico foi realizada em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 1X, através de comparações visuais com padrões de massa molecular de 50, 100 e 200 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de DNA do fago lambda. Os géis foram corados com o corante Blue Green (1 mg/mL) para a visualização das bandas de DNA. A corrida de eletroforese foi realizada a uma voltagem de 110 V durante o período de 60 minutos. O gel foi fotografado e avaliado com auxílio de um fotodocumentador. Após a quantificação do DNA concentrado, foi necessário diluir o DNA a uma concentração de 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ com água milli-Q. O material final foi armazenado a -20 °C.

3.2.3 Amplificação dos microssatélites para de tucumã-do-Amazonas

Foram utilizados neste estudo 12 locos de microssatélite desenvolvidos para *A. aculeatum* (RAMOS et al., 2012). Estes iniciadores contendo os fragmentos de microssatélites foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em um volume total de 10 μL , contendo 10 ng de DNA genômico, 1X buffer, 210 μM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,16 μM de *primer forward* e calda M13 (FAM ou NED) (SCHUELKE, 2000), 0,32 μM de *primer reverse*, 1,05 U de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) e 3,49 μL de água ultra pura. Estas amplificações via PCR foram desenvolvidas em duas etapas, a primeira etapa é específica para os iniciadores e a segunda para realizar a ligação do M13. A primeira etapa inicia estabilizando a temperatura a 68°C por 2 minutos e a 92°C por 30 segundos, e em seguida são realizados 30 ciclos do processo de desnaturação a 92°C por 30 segundos, seguido do anelamento por 35 s (temperaturas de cada iniciador descritas na Tabela 2.2) e a extensão a 68°C ou 72°C por 35 segundos. Na segunda etapa do M13 foram realizados 15 ciclos do processo de desnaturação a 92°C por 20 segundos, seguido do anelamento a 53°C por 30 segundos e da extensão a 72°C por 30 segundos, finalizando com uma extensão a 72°C por 15 minutos seguida de 68°C por 30 minutos (RAMOS et al., 2011a, 2012). As amostras foram amplificadas usando o termociclador *Veriti* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

Do produto obtido das PCRs, 2 μ L foi utilizado para realizar a eletroforese por 90 minutos em corrente 80V. Esta permitiu visualizar o grau de intensidade das PCRs no gel de agarose a 1,5% de acordo as recomendações do equipamento de eletroforese capilar. Os produtos da PCR de boa qualidade foram submetidos à eletroforese capilar no Analisador automático de DNA ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), para desta forma determinar os tamanhos dos alelos com o auxílio do marcador com tamanhos de fragmentos conhecidos, ET-550 ROX *size standard* (GE Healthcare, Amersham, Buckinghamshire, UK). As genotipagens foram observadas e analisadas com o auxílio do programa GENEMAPPER v4.0 *software* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

3.2.4 Análise estatística dos dados

Para cada par de iniciadores de microssatélite foi verificada a presença de alelos nulos utilizando o *software* MICROCHECKER (OOSTERHOUT et al., 2004) utilizando um intervalo de confiança de 95 % e 10.000 interações. Esta análise permite identificar os erros de genotipagem, ou seja, verifica a presença de alelos que não são amplificados mesmo estes existindo (alelos nulos). O programa estima os alelos nulos em cada loco, baseado nos níveis de endogamia e no efeito *Wahlund* (redução da heterozigosidade em uma população causada pela subestruturação da população), bem como nos desvios ao determinar o Equilíbrio de Hardy - Weinberg (*EHW*), o que indica que este é estimado pela frequência dos alelos.

Os parâmetros de diversidade genética, número de alelos totais (*A*), alelos privados (*AP*), heterozigosidade observada (*H_O*), heterozigosidade esperada (*H_E*), coeficiente de endogamia ou índice de fixação de Wright (*f*), e equilíbrio de Hardy – Weinberg (*EHW*) e desequilíbrio de ligação (*LD*), foram estimados para cada loco e em cada população individual com o programa *Genetic Data Analysis - GDA* (LEWIS; ZAYKIN, 2001). O *EHW* e *LD* foram realizados pelo teste exato de Fisher com 100000 permutações (método *shuffle*). O programa utiliza o teste exato de Fisher para avaliar a aderência às proporções de *EHW*, como descrito por Weir (1996) e para o teste do *LD* utiliza a média composta de desequilíbrio de ligação de Burrows (WEIR, 1979), permitindo que genótipos de dois locos sejam associados várias vezes. O nível de significância ($P \leq 0.05$) do *EHW* e *LD* foi ajustado com a correção de Bonferroni (RICE, 1989).

Procurando verificar a existência de diferenciação ou estrutura genética entre os indivíduos nas populações amostradas, foram calculadas as estatísticas *F* de Wright (1951) através dos algoritmos de Cockerham (1969) e Weir e Cockerham (1984), que apresentam

parâmetros que são conceitualmente equivalentes ou correspondentes às estatísticas F de Wright (1951), F_{IT} , F_{IS} e F_{ST} . Estas estatísticas F foram calculadas e avaliadas com significância ($P \leq 0.05$) através de 30000 *bootstrapping*, utilizando o programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2001). Em termos gerais, os níveis hierárquicos das estatísticas F de Wright (1951), como F_{IT} , F_{IS} e F_{ST} , quantificam os efeitos da endogamia (índice de fixação), sendo um indicador útil de diferenciação genética, permitindo determinar a estrutura populacional (subdivisão populacional) devido a que as frequências alélicas se tornam diferentes entre as populações (HARTL; CLARK, 2010). As análises de estrutura genética de Cockerham (1969) caracterizadas pela análise de variância das frequências gênicas (alélicas) para as populações coletadas, consideram os níveis de endogamia total nos indivíduos de todas as populações ($F = F_{IT}$), o índice de endogamia dentro das subpopulações devido ao sistema reprodutivo ($f = F_{IS}$) e a divergência ou diferenciação genética entre populações ($\Theta_P = F_{ST}$) (COCKERHAM, 1969; WEIR; COCKERHAM, 1984).

Também foram calculadas duas matrizes com os valores do índice de fixação (F_{ST}) par a par entre as populações e entre as bacias hidrográficas a que estas populações pertencem ou tem proximidade. Essas análises foram obtidas com um teste de significância ($P \leq 0.05$) realizado com 100000 permutações, sendo que o nível de significância posteriormente foi ajustado com a correção de Bonferroni (RICE, 1989). Para verificar o grau de variação genética de acordo com os níveis hierárquicos entre e dentro de populações, realizamos loco por loco a análise de variância molecular (AMOVA) com uma significância estatística que foi avaliada com base em 100000 permutações. A AMOVA foi definida por um grupo de populações, e dentro de cada população com níveis individuais, e foi definida também como um grupo de populações, e dentro de cada população sem níveis individuais (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Foi realizado também o teste de Mantel (MANTEL, 1967; SMOUSE et al. 1986) para determinar o coeficiente de correlação da matriz de distância geográfica das populações e as matrizes de distância genética linearizada (F_{ST}) (SLATKIN, 1981) e distâncias genéticas de Nei (NEI, 1978). Os testes de significância foram realizados com 100,000 permutações. Os cálculos do F_{ST} par a par, a AMOVA, a matriz linearizada F_{ST} e o teste de Mantel foram realizados com o auxílio do programa Arlequin v.3.5.1.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). As distâncias genéticas de Nei foram calculadas com o *software* GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2001) e a matriz de distâncias geográficas foi calculada utilizando o programa DIVA-GIS v. 7.5 (DIVA-GIS, 2012).

Foi realizada uma análise Bayesiana para determinar o número de clusters dentro do conjunto de acessos avaliados, utilizando o *software* *Structure* (PRITCHARD; STEPHENS;

DONNELLY, 2000) através do modelo *Admixture*. Este modelo é aplicado normalmente em populações reais ou naturais. O número de clusters (K) foi definido de 1 a 20, e para cada K foram realizadas 20 iterações, com um Burn-in de 100.000 seguido por 500.000 iterações Markov Chain Monte Carlo (MCMC). O número de clusters foi estimado utilizando o Ln da probabilidade dos dados ($\ln Pr(X/K)$) para os diferentes valores de K (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000). Com o valor de K selecionado foi realizado um consenso das iterações realizadas neste cluster, através do programa CLUMPP v.1.1.2 - *Cluster Matching and Permutation Program* (JAKOBSSON; ROSENBERG, 2007) e com o programa Distruct v. 1.1 (ROSENBERG, 2004) foi realizada a visualização gráfica da estrutura da população.

A visualização do grau de agrupamento ou dispersão da diversidade genética entre os indivíduos e as populações amostradas de *A. aculeatum* foi realizada pela Análise de Coordenadas Principais (PCoA) com base nos dados obtidos do F_{ST} par a par das populações, para examinar seu agrupamento genético, utilizando o programa GenAlEx 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

Usando o método de Neighbor Joining (SAITOU; NEI, 1987), um dendrograma entre populações foi construído, com base no consenso de matrizes de distâncias genéticas de Nei (NEI, 1978). Estas matrizes foram calculadas com o programa MAS v.4.05 (DIERINGER; SCHLÖTTERER, 2003) utilizando 1000 bootstraps para poder assim gerar um conjunto de dados múltiplos de distâncias genéticas de Nei. Este conjunto de dados múltiplos foi processado dentro do programa *Neighbor* para calcular as 1000 probabilidades de árvores (com notação *Newick notation style*), sendo que em seguida foi realizado um consenso no programa *Consense* que permitiu a obtenção de uma única matriz consenso para poder gerar o dendrograma final. Os dois programas fazem parte do pacote de inferência filogenética *Philyp* v. 3.69 (*PHYLogeny Inference Package*) (FELSENSTEIN, 2004). Este dendrograma foi visualizado no programa *FigTree* v.1.3.1 (RAMBAUT, 2009).

3.3 Resultados

3.3.1 Índices de diversidade genética

Dos 12 locos de microssatélites utilizados, os iniciadores Aac01 e Aac13 apresentaram monomorfismo para as plantas selecionadas. Estes foram, portanto, excluídos das análises. Foi observada a presença de alelos nulos em três iniciadores, sendo estes, o iniciador Aac09 nas populações Humaitá, Manicore, Novo Aripuana, Borba, Nova Olinda do Norte,

Itaquatiaria, Silves; o iniciador Aac06 nas populações de Itaquatiaria, Maués, Urucará e São Sebastião do Uatumã; e o iniciador Aac14 na população de Maués.

Os 10 locos polimórficos confirmaram o alto conteúdo de informação genética com um total de 101 alelos, variando de 3 a 21 alelos por loco, com média de 10,1 alelos por loco (Tabela 3.2). O loco Aac03 mostrou ser menos polimórfico, e o Aac21 foi o que apresentou maior polimorfismo. A heterozigiosidade esperada (H_E) variou entre 0,0964 para o loco Aac02 e 0,8724 para o loco Aac04, com uma média total dos locos de 0,5939. As heterozigiosidades observadas (H_O) apresentaram valores superiores às H_E para os locos Aac02, Aac03, Aac04, Aac10, Aac11 e Aac12. As H_O variaram entre 0,1009 para o loco Aac02 e 0,9725 para o loco Aac12. A média de todos os locos para H_O foi de 0,6390, indicando ser superior à média de H_E com 0,5939. O coeficiente de endogamia ou índice de fixação (f) nos locos apresentou valores inferiores à zero. Os locos Aac02, Aac03, Aac04, Aac10, Aac11 e Aac12 apresentaram valores negativos para o f , o que mostra um excesso de heterozigotos. Entretanto, os demais locos apresentaram um pequeno grau de endogamia para as populações avaliadas. Porém, ao nível de médias o f mostrou um valor negativo, o que mostra ausência de endogamia e excesso de heterozigotos para todas as populações e locos (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Índices de diversidade genética ao nível dos locos (iniciadores) de microssatélites obtidos a partir das 15 populações de *Astrocaryum aculeatum* coletadas no estado de Amazonas

Loco	N	A	A_p	H_E	H_O	F
Aac02	218	4	2	0,0965	0,1009	-0,0461
Aac03	218	3	-	0,5538	0,9450	-0,7092
Aac04	217	19	3	0,8725	0,9309	-0,0671
Aac06	213	19	2	0,8161	0,6338	0,2238
Aac07	217	7	1	0,6830	0,6498	0,0487
Aac09	212	21	5	0,7790	0,4859	0,3769
Aac10	217	4	1	0,5467	0,9355	-0,7140
Aac11	217	4	-	0,1193	0,1244	-0,0435
Aac12	218	7	-	0,7345	0,9725	-0,3250
Aac14	206	13	3	0,7380	0,6117	0,1716
All	215,3	10,1	17	0,5939	0,6390	-0,0761

n = número de indivíduos analisados por locos; A = número de alelos identificados; A_p = número de alelos privados; H_E = Heterozigiosidade esperada; H_O = Heterozigiosidade observada; f = coeficiente de endogamia.

Na Tabela 3.3, os 10 locos em cada população mostraram um número de alelos que variou entre 3,5 para a população Presidente Figueiredo, comunidade Rumo Certo, e 5,1 para a população Humaitá. Porém, o número médio de alelos polimórficos foi superior ao número médio de alelos para todas as populações. A H_E nas populações variou entre 0,438 para a população Presidente Figueiredo, comunidade Rumo Certo e 0,613 para a população Iranduba. Valores elevados foram observados para as heterozigiosidades observada (H_O) e esperada (H_E) para todas as populações, sendo que as H_O apresentaram valores superiores às

H_E em 14 populações, com uma única exceção para a população Itacoatiara. As H_O das populações variaram entre 0,548 para a população Presidente Figueiredo, comunidade Rumo Certo e 0,736 para a população Presidente Figueiredo – Estrada Balbina km 42. A média das H_O de todas as populações foi de 0,6390, mostrando ser superior à H_E com 0,557. O coeficiente de endogamia ou índice de fixação (f) nos locos apresentou valores inferiores à zero. Quase todas as populações apresentaram valores negativos para o f , o que mostra um excesso de heterozigotos. Porém, a única que apresentou valor positivo, e com $f=0,020$ foi a população Itacoatiara, valor que é bem próximo de zero, que indica que a população não tem endogamia (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 – Índices de diversidade genética ao nível das 15 populações, obtidas a partir de 10 locos de microssatélites desenvolvidos para *Astrocaryum aculeatum*

Municípios – Populações	n	A	A_p	A_{pol}	H_E	H_O	f
Humaitá	14,9	5,1	2	6,13	0,584	0,638	-0,097
Manicoré	15,0	4,8	1	5,75	0,572	0,653	-0,149
Novo Aripuanã	15,0	4,8	2	5,75	0,539	0,627	-0,170
Borba	15,0	4,5	1	5,38	0,583	0,673	-0,161
Nova Olinda do Norte	14,5	4,7	2	5,11	0,588	0,684	-0,169
Manaquiri	13,9	4,4	1	5,25	0,540	0,685	-0,283
Irاندوبا	12,9	4,5	1	4,50	0,613	0,674	-0,103
Itacoatiara	14,8	4,9	2	5,33	0,565	0,553	0,020
Silves	14,9	4,3	-	4,67	0,546	0,630	-0,162
Maués	15,0	4,4	1	4,67	0,595	0,620	-0,043
Urucará	15,0	4,2	1	4,20	0,552	0,620	-0,128
São Sebastião do Uatumã	13,4	4,2	1	4,56	0,548	0,649	-0,194
Presidente Figueiredo - Rumo Certo	14,7	3,5	1	4,00	0,438	0,548	-0,265
Presidente Figueiredo - estrada Balbina km 42	14,0	4,7	-	5,00	0,577	0,736	-0,289
Manaus – Tarumã-Açu	12,3	3,9	1	4,50	0,518	0,594	-0,156
Media	14,35	4,46	17	4,99	0,557	0,639	-0,153

n = número de indivíduos analisados por locos; A = número de alelos identificados; A_p = número de alelos privados; A_{pol} = número de alelos polimórficos; H_E = Heterozigocidade esperada; H_O = Heterozigocidade observada; f = coeficiente de endogamia.

As análises também mostraram um total de 17 alelos privados observados em 13 populações. Estes foram obtidos para os locos Aac02, Aac04, Aac06, Aac07, Aac09, Aac10 e Aac14 e distribuídos nas diferentes populações (Tabelas 3.3 e 3.4). A análise do EHW avaliada a partir dos 10 locos nas 15 populações mostrou que 37 interações entre loco e população não se aderem ao EHW, sendo que os locos Aac03 e Aac10 são os que apresentaram maior falta de aderência do EHW nas populações. Entretanto, os locos Aac02, Aac11 e Aac14 para todas as populações mostraram EHW (Tabela 3.4). A maioria dos locos estudados apresentou equilíbrio de ligação, com porcentagens de LD que variaram entre 2,22% para as populações de São Sebastião do Uatumã e Irاندوبا, e 24,44% para a população de Borba. Este resultado indica que a maioria dos locos segrega de forma independente (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 – Resultados obtidos para o número de combinações com desequilíbrio de ligação (*LD*), porcentagem do *LD* (*LD%*), alelos privados e valores do equilíbrio de Hardy-Weinberg obtido independentemente para cada um dos 10 locos de microssatélites em cada uma das 15 populações de *Astrocaryum aculeatum*.

Municípios	<i>CLD</i> (<i>LD%</i>)	Locos									
		Aac02	Aac03	Aac04	Aac06	Aac07	Aac09	Aac10	Aac11	Aac12	Aac14
Humaitá	-	1,0000	0,0046*	0,1858 [1]	0,0105	0,7748	0,0029* [1]	0,0007*	1,0000	0,0130	0,7137
Manicoré	4 (8,89)	1,0000	0,0138	0,0431	0,2174 [1]	0,1314	0,0012*	0,0009*	1,0000	0,1939	0,7740
Novo Aripuanã	3 (6,67)	1,0000	0,0016*	0,0077	0,7494	0,5401	0,0057 [1]	0,0002*	1,0000	0,0802	0,8715 [1]
Borba	11 (24,44)	1,0000	0,0004*	0,0579	0,9122 [1]	0,0820	0,0000*	0,0002*	1,0000	0,0154	0,3788
Nova Olinda do Norte	5 (11,36)	0,6311 [1]	0,0002*	0,4152	0,0330	0,5504 [1]	0,0003*	0,0044*	1,0000	0,0012*	0,0337
Manaquiri	7 (15,56)	1,0000	0,0005*	0,0355	0,8373	0,7804	0,1262	0,0005*	1,0000	0,0007*	0,9343 [1]
Irاندوبا	1 (2,22)	1,0000	0,0084	0,4048	0,1389	0,0146	0,0429 [1]	0,0019*	1,0000	0,0065	0,1920
Itacoatiara	6 (13,33)	1,0000	0,0280	0,3060 [1]	0,0203	1,0000	0,0000* [1]	0,5295	1,0000	0,0012*	0,6383
Silves	4 (8,89)	1,0000	0,0003*	0,8120	0,0491	0,8202	0,0174	0,0002*	1,0000	0,0083	0,6473
Maués	4 (8,89)	1,0000	0,0068	0,2930	0,0018*	0,0017*	0,3278	0,0004* [1]	1,0000	0,0246	0,0067
Urucará	3 (6,67)	1,0000 [1]	0,0005*	0,0003*	0,0047*	0,0922	0,0473	0,0003*	1,0000	0,0696	0,8027
São Sebastião do Uatumã	1 (2,22)	1,0000	0,0363	0,0262 [1]	0,0142	0,7855	0,1012	0,0045*	1,0000	0,0011*	0,8288
Presidente Figueiredo Rumo Certo	2 (4,44)	1,0000	0,0019*	0,5143	0,8196	0,4096	0,0777 [1]	0,0138	1,0000	0,0008*	0,0435
Presidente Figueiredo – Estrada Balbina km 42	2 (4,44)	1,0000	0,0012*	0,6624	0,7136	0,0630	0,0031*	0,0005*	1,0000	0,0016*	1,0000
Manaus – Tarumã-Açu	-	1,0000	0,0057	0,8830	0,3625	0,0432	0,5044	0,0057	1,0000	0,0407	0,0450 [1]

*Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg com teste exato de Fisher ($P < 0.005$, depois de ajustar a correção de Bonferroni (RICE, 1989)); *CLD* = número de combinações com desequilíbrio de ligação, selecionados com $P < 0.0011$, depois de ajustar a correção de Bonferroni (RICE, 1989); [] = número de alelos privados.

3.3.2 Estrutura genética

Os resultados das análises das estimativas das estatísticas F de Wright (1951) para os 10 locos nas 15 populações de *A. aculeatum* coletadas, mostraram que a endogamia total (F_{IT}) foi de -0,07139, a estimativa da endogamia devido ao sistema reprodutivo ou intrapopulacional (F_{IS}) foi de -0,15207, valor que foi menor em relação à endogamia devida à subdivisão (F_{ST}) com 0,070032 (Tabela 3.5). Os índices de fixação F_{ST} apresentaram-se fora dos limites superiores e inferiores do *bootstrapping*, o que indica que as estimativas são significativamente diferentes de zero. Entretanto, o F_{IT} e F_{IS} não são significativos porque incluem o zero. Estes resultados indicam e confirmam que a diversidade está mais concentrada dentro de populações do que entre as populações, e que está existindo a subdivisão de populações (panmixia).

Tabela 3.5 – Resultados das estimativas das estatísticas F de Wright (1951) obtidas para 15 populações de *Astrocaryum aculeatum* utilizando 10 locos de microsatélites específicos.

	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
Sob todos os locos	-0,15207	0,070032	-0,07139
Superior (CI _{95%})	0,07547	0,088922	0,14596
Inferior (CI _{95%})	-0,41666	0,049412	-0,33221

CI_{95%} = 95% intervalo de confiança.

A diferenciação genética obtida pelo F_{ST} par a par entre as populações mostrou que a maioria das populações difere significativamente entre si, informação observada ao comparar o nível de significância após correção de Bonferroni ($P \leq 0,00048$) com as probabilidades de cada comparação par a par (Tabela 3.6). Observa-se também que a população coletada no município de Presidente Figueiredo, comunidade Rumo Certo, foi a que mostrou maior diferenciação quando comparada com as outras populações, assim como a população da comunidade de Novo Aripuanã. As outras comparações do F_{ST} par a par mostraram valores inferiores a 0,10. A comparação F_{ST} par a par que apresentou menor diferença foi entre as populações de Silves e Maués.

Quando as populações foram agrupadas pela proximidade a alguma bacia hidrográfica e comparadas pelo F_{ST} par a par, a análise mostrou que existe diferença genética significativa entre as bacias hidrográficas, sendo que os rios Madeira e Uatumã apresentaram diferenças significativas com relação a todas as demais bacias hidrográficas (Tabela 3.7). A comparação do F_{ST} par a par com menor diferenciação entre as bacias hidrográficas foi para o rio Maués Açu. As demais bacias hidrográficas quando comparadas com os outros rios em geral

mostraram diferenças significativas. Estas informações das bacias hidrográficas também foram confirmadas ao comparar o nível de significância após correção de Bonferroni ($P \leq 0,002381$) com as probabilidades de cada comparação par a par das bacias hidrográficas. Estes resultados mostram que existe estruturação genética presente ao nível de populações e das bacias hidrográficas, observados nos valores de divergência (WRIGHT, 1951).

Os resultados da AMOVA mostram mais uma vez a existência de estrutura genética, sendo que 93.5% da variação genética é observada dentro das populações, e 6.5% entre populações, o que significa que existe uma moderada porcentagem de diferenciação entre populações (Tabela 3.8).

Tabela 3.6 – Comparações do F_{ST} par a par entre as 15 populações de *Astrocaryum aculeatum* coletadas no estado de Amazonas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1=Humaitá	0														
2=Manicoré	0,0063	0													
3=Novo Aripuanã	0,0375	0,0128	0												
4=Borba	0,0176	0,0286	0,0416*	0											
5=Nova Olinda do Norte	0,0481*	0,0623*	0,1036*	0,0296	0										
6=Manaquiri	0,0267	0,0232	0,0456*	0,0122	0,0424*	0									
7=Irlanduba	0,0700*	0,0762*	0,0813*	0,0540*	0,0597*	0,0321	0								
8=Itacoatiara	0,0677*	0,0879*	0,1262*	0,0535*	0,0339*	0,0556*	0,0696*	0							
9=Silves	0,0592*	0,0709*	0,1106*	0,0319	0,0095	0,0223	0,0374*	0,0496*	0						
10=Maués	0,0489*	0,0686*	0,1002*	0,0341	0,0199	0,0406*	0,0133	0,0546*	0,0038	0					
11=Urucará	0,0618*	0,0657*	0,1003*	0,0624*	0,0178	0,0600*	0,0568*	0,0744*	0,0125	0,0068	0				
12=S.S. do Uatumã	0,0716*	0,0729*	0,0906*	0,0486*	0,0384*	0,0694*	0,0464*	0,0756*	0,0325	0,0085	0,0072	0			
13=PF- Rumo Certo	0,1156*	0,1068*	0,1650*	0,1385*	0,1323*	0,1321*	0,1379*	0,1500*	0,1256*	0,1108*	0,1147*	0,1076*	0		
14=PF-Est. Balbina km42	0,0277*	0,0363*	0,0522*	0,0321*	0,0574*	-0,0013	0,0238	0,0752*	0,0419*	0,0282	0,0644*	0,0600*	0,1085*	0	
15=Manaus – Tarumã-Açu	0,0533*	0,0491*	0,0924*	0,0362	0,0617*	0,0097	0,0216	0,0781*	0,0461*	0,0325	0,0718*	0,0796*	0,1406*	0,0212*	0

SS= São Sebastião; PF = Presidente Figueiredo; Est. = Estrada; * = Comparações F_{ST} par a par significativas, indicando diferença entre populações ($P < 0,00048$, depois de ajustar a correção de Bonferroni (RICE, 1989)).

Tabela 3.7 - Comparações do F_{ST} par a par entre as sete bacias hidrográficas de acordo como as 15 populações de *Astrocaryum aculeatum* coletadas no estado de Amazonas

	1	2	3	4	5	6	7
1 = Rio Madeira	0						
2 = Rio Solimões	0,02570*	0					
3 = Rio Amazonas	0,03381*	0,03348*	0				
4 = Rio Urubu	0,04020*	0,02085*	0,0112	0			
5 = Rio Maués Açu	0,03998*	0,01929	0,01246	0,00375	0		
6 = Rio Uatumã	0,03433*	0,03157*	0,03368*	0,03705*	0,02172*	0	
7 = Rio Negro	0,03781*	0,00495	0,05249*	0,04606*	0,03251*	0,04613*	0

* = Comparações F_{ST} par a par significativas, indicando diferenças entre populações ($P < 0,00048$, depois de ajustar a correção de Bonferroni (RICE, 1989)); Bacias hidrográficas agrupadas de acordo a distribuição de tabela 3.1.

Tabela 3.8 – Análise da variância molecular (AMOVA) realizado para 15 populações de *Astrocaryum aculeatum* coletadas no estado de Amazonas

AMOVA - Sem níveis individuais (populações)			
Fonte de variação	Quadrado médio	Componente de variância	Porcentagem de variação
Entre populações	116,361	0,19402	6,506
Dentro de populações	1155,596	2,78819	93,493
Total	1271,957	2,98222	

P-valor =0.000 (Estimado com base em 100000 permutações).

Sob este cenário, o Teste de Mantel utilizando ambas as matrizes genéticas de F_{ST} linearizado e as distâncias genéticas de Nei combinadas com as distâncias geográficas das populações mostraram correlações baixas e não significativas (F_{ST} linearizado, $r=0,2043$, $p=0.1091$; distâncias genéticas de Nei, $r=0,3165$, $p=0,0721$). Quando estimado o número de populações geneticamente homogêneas (K) entre todos os indivíduos amostrados através da análise Bayesiana realizada pelo software *Structure*, das 15 populações, observou-se a ocorrência de três possíveis formas de agrupamento, sendo estas $K= 3$, $K= 4$ ou $K=5$ de acordo a média de $\ln Pr(X/K)$ obtidas das 20 iterações dos acessos estudados para cada K (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) (Figura 3.2). Ao visualizar cada um destes agrupamentos nos gráficos, estes mostram a formação de $K= 3$ e $K= 4$ como mais consistentes (Figura 3.3). A principal diferença entre estes dois agrupamentos é que o *cluster* $K=3$ inclui a população do município de Presidente Figueiredo - comunidade Rumo Certo com as populações São Sebastião do Uatumã, Maués, Ucurará e Presidente Figueiredo – Estrada Balbina km 42. Entretanto, o $K=4$ separa a população de Presidente Figueiredo - comunidade Rumo Certo destas populações mencionadas, e a coloca como uma única população ou agrupamento, levando a formar o quarto *cluster*. Portanto, os grupos formados, considerando $K=4$, foram: grupo I (Humaitá, Manicoré e Novo Aripuanã), grupo II (Borba, Nova Olinda do Norte, Manaquiri, Iranduba, Itacoatiara, Silves e Manaus Tarumã-Açu), grupo III (Presidente Figueiredo - comunidade Rumo Certo), e grupo IV (São Sebastião do Uatumã, Maués, Ucurará e Presidente Figueiredo – Estrada Balbina km 42) (Figuras 3.3 e 3.4).

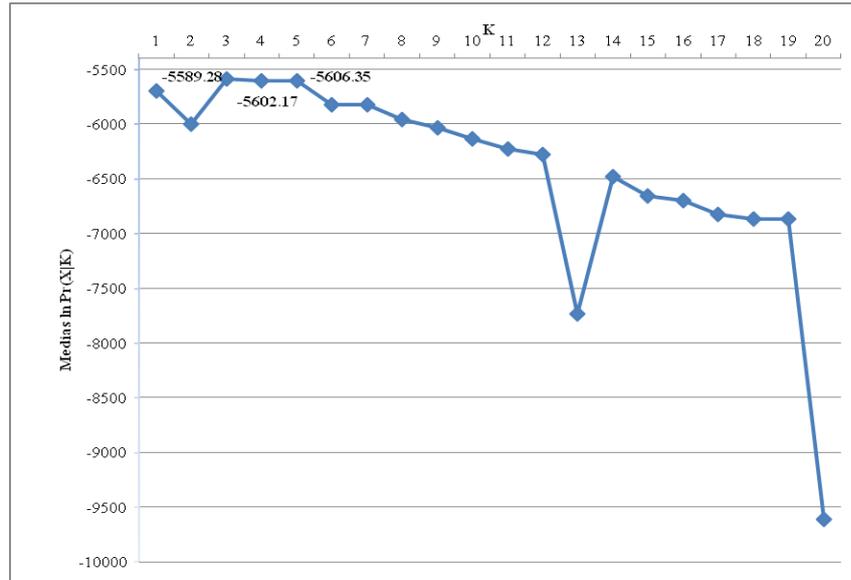


Figura 3.2 – Valores das médias $\ln Pr(X/K)$ para cada valor de K obtidas pela análise Bayesiana. O maior valor $\ln Pr(X/K)$ representa o valor ideal de K de acordo com o proposto por Pritchard, Stephens e Donnelly (2000).

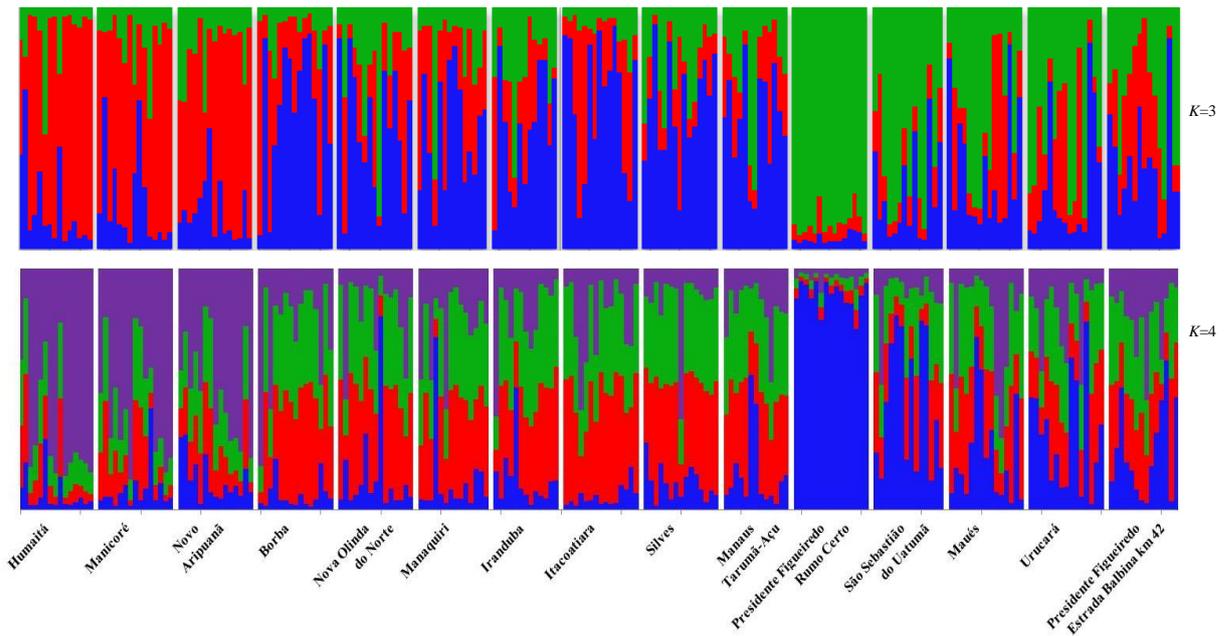


Figura 3.3 – Análise da estrutura genética das 228 matrizes selecionadas nas 15 populações de *Astrocaryum aculeatum* a partir de 10 locos microssatélites, realizadas no programa *Structure* (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000). Indicando que os genótipos foram classificados em dois possíveis agrupamentos, $K=3$ e $K=4$. As populações foram agrupadas no sentido de região norte, sul e centro do Amazonas.

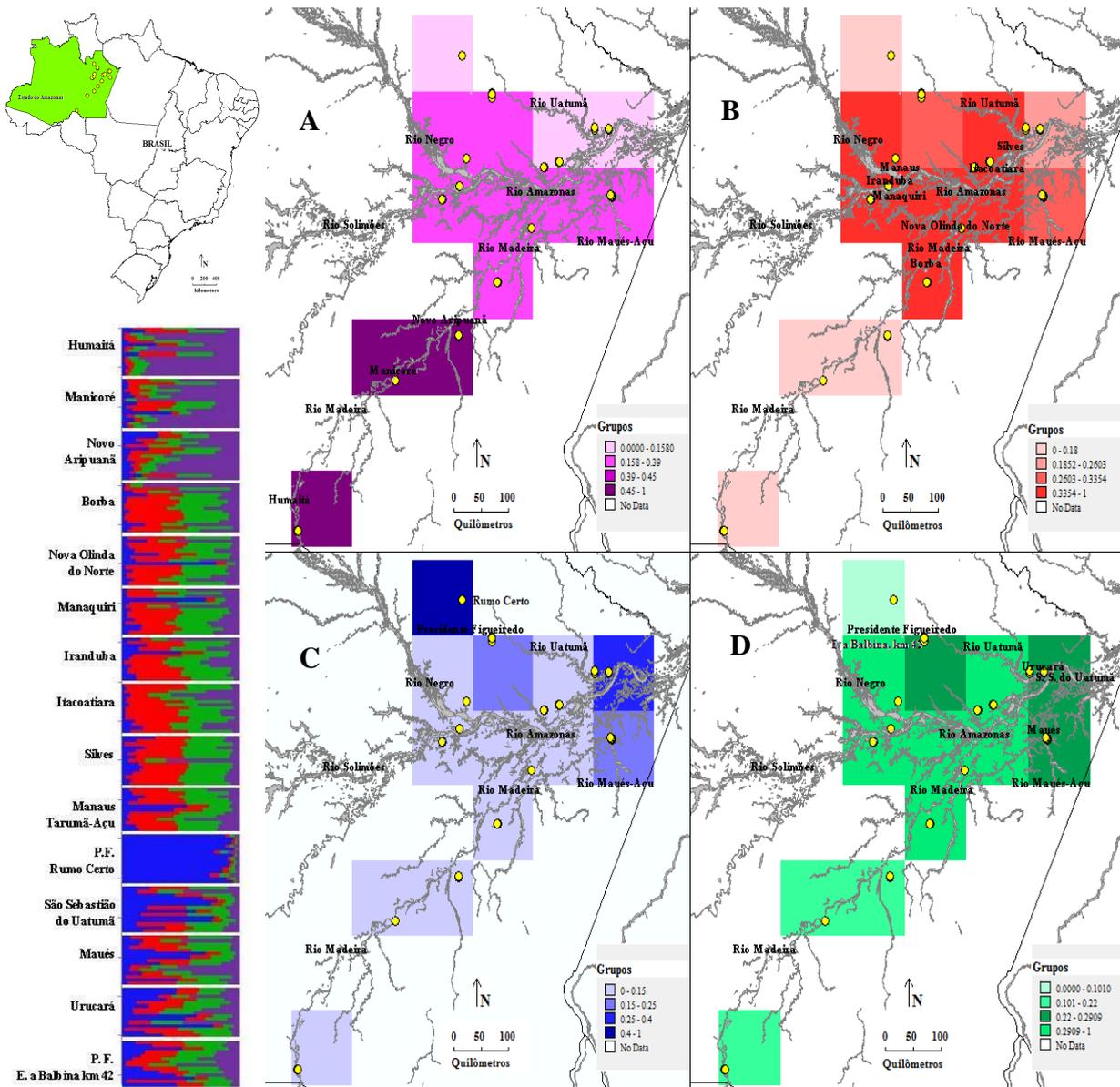


Figura 3.4 – Representação geográfica da composição genética das 228 matrizes selecionadas nas 15 populações de *Astrocaryum aculeatum* a partir de 10 locos microssatélites, estimado no programa *Structure*. Um mapa é mostrado para cada um dos quatro grupos detectados, a partir das estimativas q_K obtidas de cada planta avaliada. Os mapas de: (A) Agrupamento com as populações da cabeceira do rio Madeira; (B) Agrupamento com populações próximas à formação do rio Amazonas, sendo estes os rios Negro, Solimões e Madeira; (C) População isolada pela barragem de Balbina; (D) Populações próximas do baixo rio Amazonas. Mapa criado por S.L.F. Ramos, utilizando o programa DIVA-GIS v. 7.5 (DIVA-GIS, 2012).

Utilizando a PCoA para procurar o agrupamento das populações em um espaço multidimensional, foi observado nos gráficos de coordenadas que os três primeiros explicaram 47,3%, 28,5% e 9,7% de variação genética neutra entre as populações, e todas estas coordenadas explicam 85,5% da variação total. Estes resultados do PCoA indicam que existe separação entre as populações, mostrando que há estruturação e confirmando os dados obtidos pela análise bayesiana para o agrupamento $K=4$ (Figura 3.5). Para a combinação das três coordenadas, a população do município de Presidente Figueiredo - comunidade Rumo Certo é a mais distante da origem destas coordenadas, representando um agrupamento isolado das demais. As outras populações nos gráficos formariam um único grupo, porém quando as populações foram identificadas de acordo com os resultados do programa *Structure* com $K=4$, estas se agruparam e confirmaram os resultados desta análise, mostrando nas três coordenadas mais três agrupamentos consistentes para as populações (Figuras 3.5A e 3.5B). O primeiro agrupamento foi formado pelas populações de Humaitá, Manicoré e Novo Aripuanã, sendo mais evidente na Figura 3.5A. O segundo agrupamento foi formado pelas populações de Maués, Presidente Figueiredo – Estrada Balbina km 42, São Sebastião do Uatumã e Urucará, sendo este grupo mais evidente na Figura 3.4B. Outro agrupamento observado consistentemente nas coordenadas um e dois, foi formado pelas populações de Borba, Iranduba, Itacoatiara, Manaquiri, Manaus, Nova Olinda do Norte e Silves. Entretanto, este agrupamento é muito disperso na coordenada três (Figura 3.5B).

O dendrograma, que está indicando pouca consistência na formação dos grupos de acordo com a análise de *bootstraps*, classificou as populações em quatro grupos, os quais não coincidem com os quatro grupos da análise bayesiana, mas seu agrupamento faz sentido em função tanto de sua proximidade geográfica como genética, como será descrito a seguir (Figura 3.6). O primeiro grupo juntou num sub-grupo as populações de Manaus e Iranduba, cidades muito próximas geograficamente e unidas por uma estrada, estando localizadas exatamente na área de formação da bacia do rio Amazonas, entre a bacia do Rio Solimões e Rio Negro, o que pode explicar sua maior similaridade genética. Ambas encontram-se no grupo II da análise do *Structure*. Num outro sub-grupo estão as populações de Manaquiri e Presidente Figueiredo – Estrada Balbina Km 42 (grupos II e IV do *Structure*, respectivamente), e ambas também são próximas da área de formação da bacia do rio Amazonas entre a bacia do Rio Solimões e o Rio Negro e apresentam uma proximidade geográfica. Ainda o primeiro grupo do dendrograma juntou num terceiro sub-grupo as populações de Humaitá, Manicoré, Novo Aripuanã e Borba, sendo que as três primeiras foram classificadas no grupo I e a última no grupo II pela análise do *Structure*, mas todas pertencem

à bacia hidrográfica do rio Madeira, mostrando que existe um fluxo de material genético entre as populações desta bacia hidrográfica. Foi observado também que a população de Humaitá apresenta maior semelhança genética com a população de Manicoré. Este resultado estaria relacionado com o fato de que a população de Humaitá foi coletada numa área que ha uns 25 anos atrás era uma margem do rio Madeira, e atualmente esta população de *A. aculeatum* se encontra afastada deste rio, o que pode ter levado as plantas amostradas a conservar sua diversidade e estrutura genética, e por isso ser similar à população de Manicoré.

Um segundo grupo no dendrograma (Figura 3.6) classificou as populações de Nova Olinda do Norte, Itacoatiara, Silves, Urucará e Maués, sendo que as populações de Maués e Urucará foram classificadas no grupo IV, e as demais no grupo II pela análise do *Structure*. Essas cinco populações apresentam uma grande proximidade geográfica, e o transporte de material vegetal para consumo é comum entre os habitantes destas populações, permitindo o fluxo genético da espécie, além de que, a população de Nova Olinda do Norte (rio Madeira), Silves (rio Urubu) e Maués (rio Maués-Açu) são afluentes da bacia hidrográfica do rio Amazonas e estas populações se encontram muito próximas a estas uniões com o rio Amazonas, sendo que nas épocas das enchentes esta bacia do rio Amazonas, penetra em partes destas áreas. As populações de Itacoatiara e Urucará estão na bacia hidrográfica do rio Amazonas. Já a população de São Sebastião do Uatumã foi classificada num terceiro grupo isolado das demais, embora tenha sido classificada no grupo IV pela análise do *Structure*. E um quarto grupo classificou a população da comunidade de Rumo Certo no Município de Presidente Figueiredo, que apresenta uma constituição genética diferente das demais de acordo com a análise do *Structure* para $k=4$. Pode-se explicar este evento pelo fato desta população ter sido isolada pela barragem de Balbina, além de que esta população se encontra numa área que é uma pequena ilha dentro desta barragem. As populações dos grupos III (São Sebastião do Uatumã) e IV (Presidente Figueiredo, comunidade Rumo Certo) se encontram na mesma bacia hidrográfica do rio Uatumã.

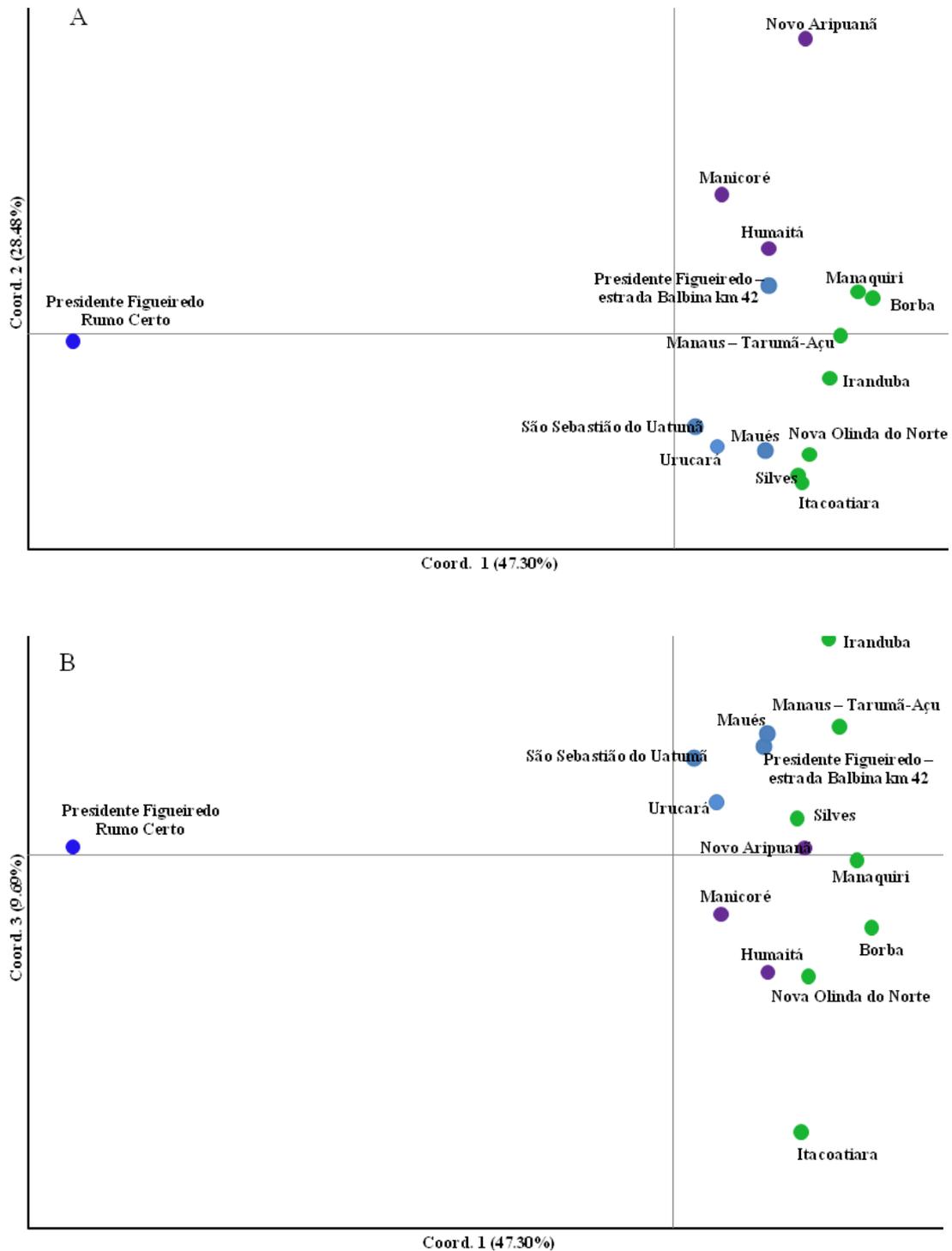


Figura 3.5 - Análise das coordenadas principais mostrando os três primeiros eixos (A, os eixos coord.1 e 2; B, eixos das Coord. 1 e 3) com base nas comparações do F_{ST} par a par do *Astrocarylum aculeatum*. As cores representam os agrupamentos obtidos no valor de $K=4$ obtida na análise Bayesiana.

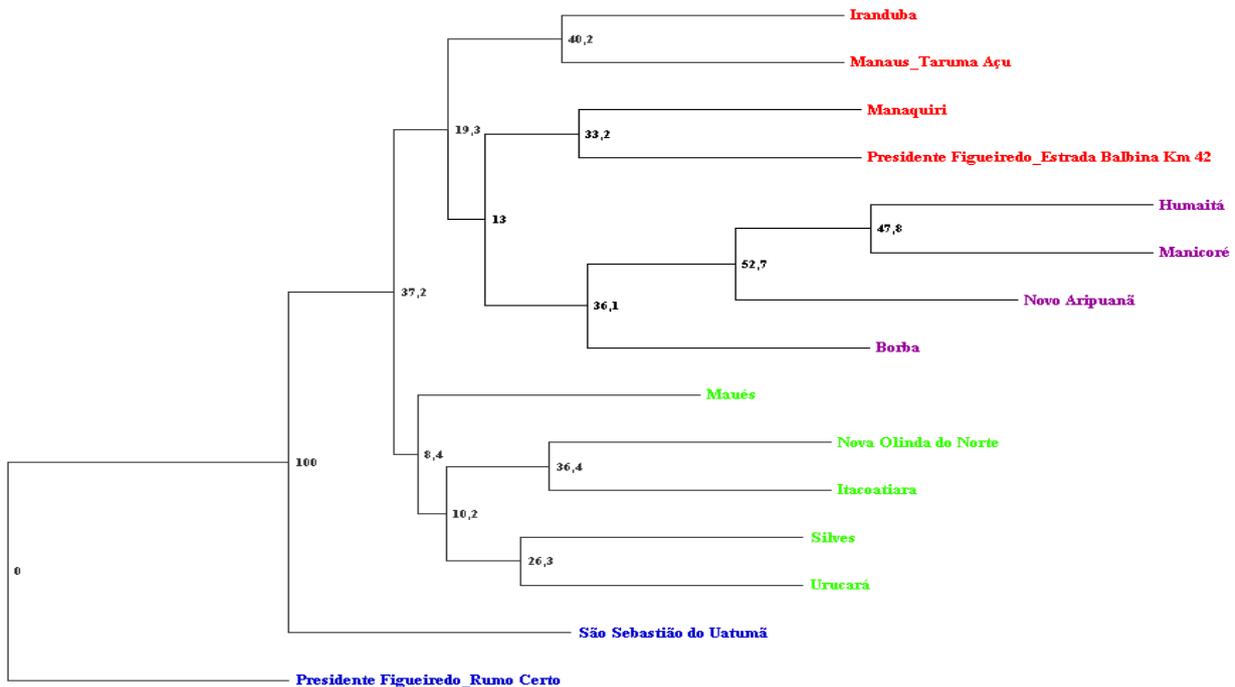


Figura 3.6 - Dendrograma obtido pelo método de “Neighbor-Joining” através das distâncias genéticas de Nei (NEI, 1978). As populações marcadas em vermelho são oriundas de municípios próximos à capital Manaus. As populações marcadas com roxo são oriundas do alto rio Madeira, e as de cor verde mostram as populações que se encontram no baixo rio Madeira. Enquanto os marcados em azul são populações do rio Uatumã.

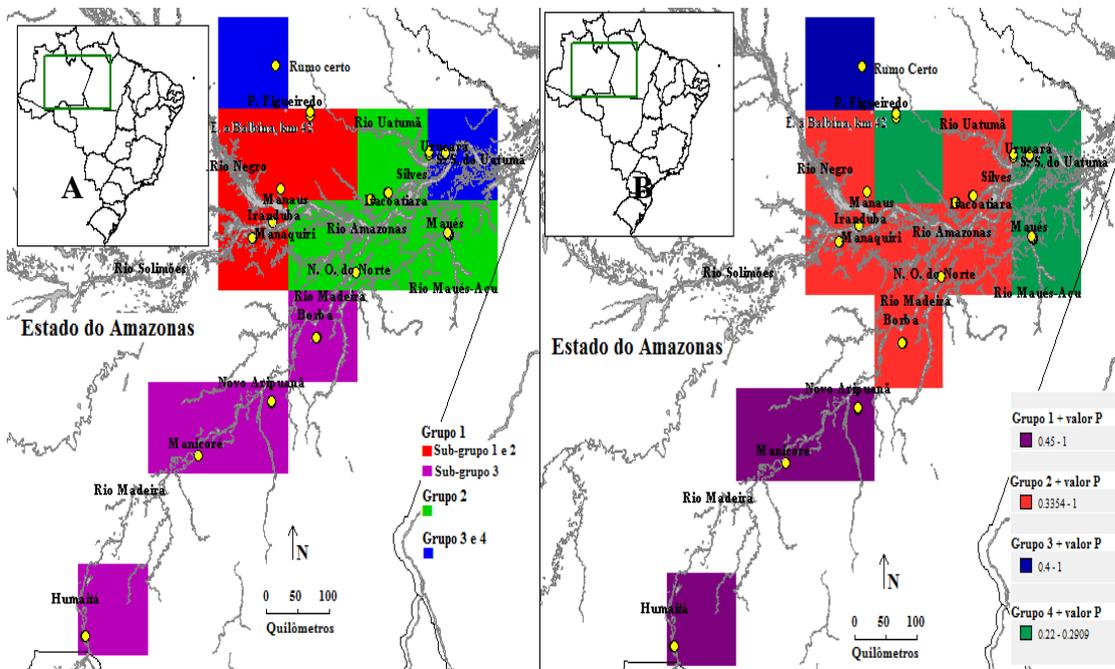


Figura 3.7 – Representação geográfica comparativa dos resultados obtidos para os diferentes agrupamentos do: (A) dendrograma (Figura 3.6) com o método de “Neighbor-Joining”, e (B) análise da estrutura (Figura 3.3) realizada com o programa *Structure*. Mapa criado por S.L.F. Ramos, utilizando o programa DIVA-GIS v. 7.5 (DIVA-GIS, 2012)

3.4 Discussão

3.4.1 Índices de diversidade genética

Esta pesquisa constitui, para o tucumã-do-Amazonas, o primeiro estudo relacionado à diversidade e estrutura genética com genótipos superiores com alta produtividade e qualidade de fruto (plantas selecionadas) em diferentes populações naturais, visando o manejo da espécie ao nível tanto *in situ* como *ex situ*, em prol dos agricultores tradicionais da Amazônia e futuros empreendimentos.

O uso de iniciadores de microssatélites em amostras do genoma de diferentes populações de *A. aculeatum* revelaram altos índices de diversidade genética, onde podemos destacar o alto conteúdo de informação genética observada pelo número médio de alelos por loco (10,1). Este resultado foi superior ao encontrado em outros estudos sobre populações de palmeiras, utilizando marcadores microssatélites. Ribeiro et al. (2010) utilizando 13 iniciadores de microssatélites para identificar a estrutura populacional de coco (*Cocos nucifera* L.) no Brasil, encontraram uma média de 5,2 alelos por loco. Outra pesquisa, com 21 genótipos de três acessos de coco, detectou um total de 68 alelos em 13 marcadores microssatélites, obtendo uma média de 4,83 alelos (KONAN et al., 2007). Quando utilizados sete iniciadores de microssatélites para identificar a variabilidade genética entre acessos da espécie *Euterpe oleracea* Mart., foi encontrada uma média de seis alelos por loco (OLIVEIRA et al., 2010). Assim, os resultados do número de alelos por loco do presente estudo são uma indicação de elevada diversidade genética para a espécie.

Foram observados também alelos privados em 13 populações provenientes de sete iniciadores. A identificação de alelos privados é útil para aplicar na conservação genética e poder identificar populações que merecem manejo especial (KALINOWSKI, 2004). Mas para ter melhor inferência com relação aos alelos privados em *A. aculeatum*, seria importante e necessário realizar outras coletas e com maior número de indivíduos por população para observar se existe variação na frequência destes alelos. Porém, estas coletas seriam realizadas em plantas não elites, já que este estudo foi realizado sobre plantas com características desejáveis de produção e qualidade do fruto em todas as populações.

No presente estudo, as médias dos índices de fixação (f) apresentaram valores negativos ao nível dos iniciadores (locos) e das populações. Esta informação foi obtida quando comparados os níveis das heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E) destas populações, indicando em média que as H_O foram superiores as H_E , informação que indica uma elevada diversidade genética (NAZARENO; REIS, 2014), mostrando um excesso de

heterozigotos na população. Este resultado influencia no coeficiente de endogamia ou índice de fixação (f) obtendo valores inferiores à zero na espécie. Este resultado de baixos valores de f e altas H_O apresenta relação com o tipo de reprodução da espécie, mostrando que a mesma se reproduz por alogamia. Resultados prévios sobre o sistema reprodutivo aplicando marcadores moleculares em plantas adultas e progênies da espécie apresentaram este tipo de estratégia reprodutiva (RAMOS et al., 2011a), o que indicaria também, que possivelmente é uma estratégia do gênero, como observada em *A. mexicanum* (EGUIARTE; PEREZ-NASSER; PIÑERO, 1992). Resultados semelhantes foram identificados em outras espécies de palmeiras, como em *Geonoma schottiana* (SILVA; VIEIRA; CARVALHO, 2011), *Phoenix dactylifera* (ARABNEZHAD et al., 2012) e *Oenocarpus bataua* (OTTEWELL et al., 2012).

Ao comparar os níveis de heterozigosidade observada e esperada obtidos neste estudo ($H_O = 0,639$ e $H_E = 0,557$) com outras espécies de palmeiras, como *Butia eriospatha*, esta apresentou valores máximos de H_O e H_E em populações adultas de 0,47 e 0,49, respectivamente (NAZARENO; REIS, 2014). Em uma coleção de germoplasma de dendê (*Elaeis oleifera*), quando caracterizados novos iniciadores de microssatélites a H_E média apresentou 0,262 (ZAKI et al., 2012). Em acessos da espécie *Euterpe oleracea* as médias das H_O e H_E foram 0,54 e 0,75, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2010). Os resultados obtidos para o tucumã-do-Amazonas, quando comparados com outras espécies, mostram uma alta diversidade genética para espécie. Esta é uma informação importante para a exploração e o processo de domesticação de *A. aculeatum*, já que a domesticação é geralmente considerada como o ponto final de um contínuo que começa com a exploração de plantas silvestres, prossegue através do cultivo de plantas selecionadas na natureza, mas ainda não geneticamente diferentes de plantas silvestres, e termina na fixação, por meio da seleção humana (PICKERSGILL, 2007).

Observando os resultados obtidos com relação ao modelo do EHW, as frequências alélicas mostram que os iniciadores de microssatélites nas diferentes populações apresentaram em sua maioria aderência a este modelo. A análise de EHW indica também que possivelmente existam alelos nativos que estejam mais adaptados às condições locais. Esta adaptação local é causada pela neutralidade condicional em muitos locos, onde alelos apresentam diferenças de eficiência em diferentes ambientes (ANDERSON; WILLIS; MITCHELL-OLDS, 2011). As populações de *A. aculeatum* avaliadas estão distribuídas geograficamente em dois tipos de clima, Af e Am, de acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger (KOTTEK et al., 2006), o que levou, possivelmente, alguns locos a apresentarem falta de aderência ao EHW.

É importante também destacar que o algoritmo utilizado para estimar as frequências de alelos nulos é dependente das frequências alélicas obtidas pelos iniciadores de microssatélites, fato que poderia ter levado à obtenção de alelos nulos em três iniciadores, e em diferentes populações. Porém, este algoritmo assume que a população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg (OOSTERHOUT et al., 2004), no qual não existem forças evolutivas atuando, por ser um modelo referencial, a não ser por aquelas impostas pelo próprio processo reprodutivo (HARTL; CLARK, 2010). No entanto, este algoritmo de estimação do alelo nulo não é aplicável em populações que apresentam desvios na panmixia, devido ao fato de que muitas populações naturais não apresentam condições de equilíbrio (OOSTERHOUT; WEETMAN; HUTCHINSON, 2006), como por exemplo, o resultado da estrutura de reprodução local ou mistura, onde as populações podem afastar-se das proporções de EHW (OOSTERHOUT; WEETMAN; HUTCHINSON, 2006). Assim, para este estudo, consideramos todos os 10 iniciadores de microssatélites independente deste resultado, já que cada população apresenta uma grande distância geográfica uma da outra na maioria dos casos, e que estes podem ser influenciados por algum evento evolutivo, levando a criar esta falta de condição de EHW para alguns iniciadores em determinadas populações.

3.4.2. Estrutura genética

As 15 populações de *A. aculeatum* amostradas nas diferentes bacias hidrográficas da Amazônia brasileira usando os marcadores microssatélites apresentaram uma moderada diferenciação genética pelas estatísticas F de Wright (HARTL; CLARK, 2010), ($F_{ST} = 0.07003$), o que indica que existe moderada estrutura genética entre populações, ou seja, indica a existência de subdivisão da população. Também confirma que do total da variabilidade genética observada para as populações amostradas ($F_{IT} = -0,07139$), a maior parte encontra-se dentro das populações ($F_{IS} = -0,15207$). Esta informação de que a maior concentração da diversidade ocorre dentro de populações foi confirmada pela AMOVA.

Os diferentes graus de diferenciação entre populações pela análise F_{ST} par a par, mostraram significância para grande parte das populações, o que confirma o comportamento esperado, de que as populações apresentam estrutura genética. Este resultado pode estar fortemente influenciado pelas características da espécie, assim como pela capacidade de dispersão de seu material genético, do grau de isolamento da população, do sistema de autoincompatibilidade e diversidade alélica que esta apresenta (LEDUCQ et al., 2011). Sendo assim, quando as populações foram agrupadas em nível de bacia hidrográfica em que estas

foram coletadas para realizar a análise do F_{ST} par a par, foi observado certo grau de isolamento ao mostrar significância, principalmente nas bacias dos rios Madeira e Uatumã, observado quando comparadas com outras bacias hidrográficas. Estas bacias hidrográficas são opostas geograficamente, já que a do rio Madeira encontra-se distribuída na região sul da Amazônia, enquanto a do rio Uatumã está distribuída na região norte da Amazônia (Figura 3.1). Estes valores de divergência indicam que existe estruturação genética entre as populações (WRIGHT, 1951) e que estas podem estar agrupadas de acordo com as bacias hidrográficas mais próximas. Devemos lembrar também que o tucumã-do-Amazonas é uma espécie que apresenta a característica de reprodução por alogamia (RAMOS et al., 2011a), e que o fluxo gênico entre populações é uma característica importante no processo de estruturação genética, porém este pode ser influenciado pela distância geográfica entre populações, ou pelo isolamento que as bacias hidrográficas promovem entre as populações através de uma possível vicariância. Além disso, em muitas espécies a quantidade de fluxo gênico entre as populações é inversamente proporcional às distâncias geográficas entre elas, porque os indivíduos são mais propensos a se dispersar para locais próximos, evento conhecido como isolamento por distância (FREELAND; KIRK; PETERSEN, 2011), como observado entre as bacias hidrográficas dos rios Urubu e Maués Açu na análise do F_{ST} par a par.

A extensão geográfica entre as populações mais distantes deste estudo abrange 820,87 km (Humaitá e Urucará) e a de menor distância apresenta 25,68 km (Urucará e São Sebastião do Uatumã), ambas em linha reta. Sob esta informação de distância geográfica, quando observamos novamente os resultados das comparações da análise do F_{ST} par a par, confirma-se a estruturação das populações, sustentando a hipótese de que o fluxo de material genético que é compartilhado entre estas populações é inversamente proporcional às distâncias geográficas entre elas, porque os indivíduos são mais propensos a se dispersar para locais próximos (isolamento por distância). Entretanto, o teste de Mantel não sustenta a hipótese, porque ao correlacionar a distância geográfica (como limitante da dispersão) e a distância genética como possíveis condutores de dissimilaridade na composição das populações (FREELAND; KIRK; PETERSEN, 2011; KRISTIANSEN et al., 2012) de *A. aculeatum*, elas apresentam uma correlação genética positiva, porém não significativa, sugerindo que as frequências alélicas obtidas nas populações estudadas não dependem das distâncias geográficas.

Esta informação do teste Mantel, juntamente com os outros resultados de diversidade e estrutura genética, poderia estar indicando que as populações de *A. aculeatum* são separadas

apenas pelo processo de vicariância, já que populações de plantas são muitas vezes separadas umas das outras por áreas de habitat inadequado sobre o qual a migração e o fluxo gênico são limitados (PANNELL; FIELDS, 2014). Além de que as populações avaliadas de *A. aculeatum* também podem estar em um processo evolutivo de forma independente umas das outras, considerando que os grupos de indivíduos que ocupam diferentes partes da distribuição de uma espécie podem evoluir de forma relativamente independente uns dos outros sob a influência da deriva e seleção local (PANNELL; FIELDS, 2014). Isto é, particularmente notável em florestas tropicais, que apresenta vários tipos de ambientes, como florestas densas e mais abertas, florestas inundadas e não inundadas ("terra firme") e uma grande variedade de formações vegetais e zonas de transição (KATZ et al., 2012).

Estas informações também sugerem que as populações de tucumã-do-Amazonas teriam iniciado o processo de formação das subpopulações há pouco tempo, tendo em consideração que a espécie se estabelece em áreas desmatadas (RAMOS et al., 2011b.), e em vista que o processo de desmatamento da Amazônia Brasileira se iniciou nos anos 1960 (CAVIGLIA-HARRIS; SILLS, 2005) associada à ocupação econômica promovida por incentivos governamentais e políticos, para logo ser impulsionada pela pecuária, madeireiros e pequenos agricultores a partir do ano de 1990 (EGLER et al., 2013). Isso significaria que o tucumã-do-Amazonas apresentaria três momentos, antes e após o início do desmatamento e na atualidade.

Antes do desmatamento, que seria conhecido como o processo de dispersão, o tucumã-do-Amazonas dividia seu espaço com uma alta diversidade de espécies de plantas, que geralmente resulta em uma baixa densidade de todas as espécies (LIEBERMAN; LIEBERMAN, 2007). Assim, em áreas de florestas tropicais clímax, sem diferenças ambientais marcantes, o acaso pode influenciar em quais espécies germinar e estabelecer-se em uma determinada área, formando os mosaicos de espécies (LIEBERMAN; LIEBERMAN, 2007), além de que esta enorme diversidade de espécies de plantas fazem uso do mesmo conjunto de matérias-primas para apoiar as suas funções metabólicas e são muito semelhantes entre si em termos de demandas de recursos, fontes de energia, método de absorção de nutrientes, e mesmo a bioquímica, em termos de semelhança geral de uma espécie para outra (LIEBERMAN; LIEBERMAN, 2007). Neste momento, antes do início do desmatamento, a distribuição da espécie nas diferentes partes da Amazônia poderia ser relacionada com o processo de domesticação do tucumã-do-Amazonas, que provavelmente tenha sido iniciado pelos Ameríndios (CLEMENT, 2001). Evento que pode estar muito relacionado com o comportamento destes, porque os ameríndios apresentavam um sistema tradicional de

subsistência com alta diversificação de espécies, construindo agroecossistemas complexos, incluindo produtos madeireiros e não madeireiros (CAVIGLIA-HARRIS; SILLS, 2005).

Porém, em termos gerais, além da dispersão que poderia ter sido iniciada pelos ameríndios, o tucumã-do-Amazonas apresenta um padrão de dispersão primário que consiste na chuva de sementes, geralmente concentrada no raio de projeção da copa de 3,5 m (LOPES et al., 2012). A dispersão secundária é feita por roedores dispersores acumuladores (cutias - *Dasyprocta* sp. e cutiaras, *Myoprocta* sp.), que depositam sementes nas proximidades das plantas (JORGE; HOWE, 2009) e também pelo homem, que transporta o fruto para consumir, vender ou transportar para outras áreas (LOPES et al., 2012). Esta dispersão de sementes é importante para determinar a colonização de novos sítios e migração entre populações vizinhas, principalmente se é zoocórica, porque a faixa de dispersão de sementes pode ser substancialmente maior (BARLUENGA et al., 2011). Entretanto, nas coletas do tucumã-do-Amazonas nas diferentes bacias hidrográficas, foi observado que a produção de produtos agrícolas já domesticados, incipientemente domesticadas ou coletados de forma extrativista nas florestas amazônicas por agricultores da Amazônia é comercializada entre estas populações, e estes utilizam o transporte fluvial principalmente para este fim, transportando material genético para outras áreas da Amazônia, o que indica que esta variável externa de conectividade é um vetor de dispersão que influencia o movimento de sementes, que leva a planta a ter capacidade de persistir, expandir e colonizar novos habitats (LIU et al., 2013).

O segundo momento, que poderíamos determinar como o processo de formação e expansão das populações de *A. aculeatum*, teria iniciado no ano de 1960, no início e após o período de desmatamento da Amazônia. Em áreas da região amazônica onde a espécie estava presente, após o desmatamento, teria ocorrido a formação e expansão das populações naturais de *A. aculeatum* na região. Esta formação e expansão de grandes ou pequenas populações naturais em áreas antropizadas pelo desmatamento estariam relacionadas com a dispersão zoocórica, e como os pirênios (tegumento com amêndoa) de *A. aculeatum* que estavam presentes no banco de sementes das florestas clímax antes de serem perturbadas, iniciaram o processo de restauração destas áreas antropizadas. Com o desmatamento por meio de corte e queima, é normal que os bancos de sementes iniciem o processo de restauração nestas áreas antropizadas (UHL, 1988), já que os solos das florestas tropicais são muitas vezes considerados como o local final onde diásporos de plantas são depositados (CORRÊA; FISCHER; SANTOS, 2012). Este processo poderia ter levado à hiper - proliferação de árvores de *A. aculeatum*, como é o caso das várias espécies de palmeiras que são denominadas de ocorrência secundária e invasivas na Amazônia, como *Astrocaryum acaule*, *Attalea*

humilis, *Bactris maraja* e *Lepidocarium tenue*, que são conhecidas por aumentar suas densidades em habitats perturbados (SCARIOT, 1999). Outro fator que permitiu o estabelecimento do tucumã seria o fato de que quando é realizada a prática do corte e queima no processo do desmatamento, o banco de sementes experimenta uma grande diminuição na densidade, riqueza e viabilidade das sementes (VIEIRA; SCARIOT, 2006), diminuindo a competição por recursos com outras espécies perenes para o tucumã-do-Amazonas. Esta perda no banco de sementes é devido aos efeitos da queima, onde a temperatura a 7.5 cm acima do solo alcança um intervalo entre 148-593⁰C, na superfície do solo este intervalo varia de 67-310⁰C, e a 1 cm abaixo da superfície do solo a temperatura estaria entre 48-199⁰C (UHL et al., 1981). Entretanto, o tucumã-do-Amazonas é uma espécie pioneira nestas áreas antrópicas, que tem capacidade de suportar temperaturas elevadas do solo resultantes destas queimadas, e esta mudança brusca de temperatura pode causar trincas e fissuras no tegumento do pirênio devido à rápida distensão (RAMOS et al, 2011b) que permite a livre entrada de água e gases, e minimiza possíveis impedimentos físicos para o desenvolvimento do eixo embrionário (BRASIL, 2009).

O terceiro momento para a dispersão desta espécie estaria relacionado já com o processo de estabelecimento destas novas populações, apresentando nestas áreas indivíduos com diferentes níveis de parentesco, com caracteres de história vital (CHV), e ação compensatória (*trade-off*). Estes CHV estão correlacionados com caracteres para reprodução e sobrevivência, o que permite prever quanto tempo a espécie ou população terá para se reproduzir tendo em consideração a idade de amadurecimento (que coincide muitas vezes com o primeiro evento reprodutivo) e a idade do último evento reprodutivo (início da senescência) (FUTUYMA, 2005). O *trade-off* é devido a adaptações que surgem por seleção natural (não ao acaso e sim direcionadas) na evolução (FUTUYMA, 2005), que estará relacionada aos recursos disponíveis e suas mudanças e competência com outros indivíduos (seleção direcionada). As populações de *A. aculeatum*, por serem populações possivelmente novas, estão ainda em processo de adaptação, devido ao fato de que os indivíduos de *A. aculeatum*, teriam desenvolvido a estratégia ou síndrome *k*, presente nas espécies alógamas perenes que se caracterizam por apresentar grande esforço de polinização e grande taxa de crescimento (genotípico), e maior idade para o amadurecimento sexual. Quando a densidade populacional se aproxima do equilíbrio *k* (patamar máximo de crescimento), um genótipo mais competitivo pode sustentar um crescimento positivo, enquanto competidores inferiores declinam em altas densidades (FUTUYMA, 2005). Sob esta possibilidade, é cada vez mais claro que as populações de tucumã-do-Amazonas são novas e que estão em processo de

adaptação e diferenciação umas das outras, já que mesmo dentro das populações contínuas, a heterogeneidade ambiental pode trazer uma excelente dimensão da estrutura genética com a evolução da adaptação local (AUDIGEOS et al., 2013).

Estas informações de vicariância, possíveis momentos históricos e processo evolutivo de adaptação, são confirmados pelos agrupamentos obtidos na análise Bayesiana. Isto se observa principalmente pelo agrupamento $K=4$, uma vez que dentro destes agrupamentos a população de Presidente Figueiredo - comunidade Rumo Certo formou um único agrupamento, fato que estaria relacionado com o isolamento por vicariância desta população, porque esta se encontra em uma ilha dentro da barragem de Balbina. O início da construção desta infraestrutura foi em 1981 e a barragem foi encerrada em 01 de outubro de 1987, levando à formação de um reservatório que apresenta um arranjo de interconexão reticulada entre remansos, ou seja, é um labirinto de canais entre as cerca de 1500 ilhas e 60 afluentes (FEARNSIDE, 1989), o que permitiu que um genótipo mais competitivo nesta população sustentasse um crescimento positivo, se destacando das outras (FUTUYMA, 2005) devido à heterogeneidade ambiental que trouxe uma estrutura genética com a evolução da adaptação local (AUDIGEOS et al., 2013). Confirmando mais uma vez que as populações de *A. aculeatum* são relativamente novas, e que apresentam uma estrutura por vicariância. Quando observamos os resultados obtidos no PCoA, estas sustentam as semelhanças e diferenças entre as populações de tucumã-do-Amazonas, revelando e confirmando a conectividade das populações de acordo com o grupo em que estas se encontram, que são semelhantes ao da análise Bayesiana. Os resultados da análise de agrupamento, observado no dendrograma, confirmam que a maioria das populações sempre estão próximas geograficamente umas das outras, porém, estas se separam e formam outro grupo quando apresentam alguma barreira geográfica, como é o caso das bacias hidrográficas dos rios Madeira e Uatumã.

Com relação ao manejo da espécie, os resultados genéticos indicam que a conservação da espécie deve ser realizada principalmente ao nível das bacias hidrográficas, como indicam todos os resultados obtidos nas diferentes análises. É importante também realizar comparações ao nível de dados morfo-agronômicos por análises descritivas e multivariadas e de componentes principais, para assim identificar os indivíduos mais divergentes em cada população, avaliando sua produção, e realizando outros estudos de melhoramento para obter progênies com características desejáveis para a espécie. Todas estas informações são importantes para a conservação e manejo, permitindo direcionar as políticas de manejo da espécie nas bacias hidrográficas da Amazônia.

3.5 Conclusões

A avaliação das populações de *A. aculeatum* através de plantas selecionadas pela qualidade do fruto, mostrou que existe alta diversidade genética dentro de populações. Entretanto, a estrutura genética desta espécie é moderada, já que este parâmetro dentro da genética destas populações é dependente da vicariância que existe entre as populações, uma vez que não existe interferência das distâncias geográficas para o fluxo de material genético. Outra possível causa para esta moderada estrutura seriam os três possíveis eventos históricos e evolutivos que a espécie apresentou, levando a acreditar que estas populações são relativamente novas. Os agrupamentos obtidos na análise de estrutura genética são importantes para a conservação e manejo da espécie, permitindo direcionar políticas de manejo da mesma nas bacias hidrográficas da Amazônia.

Referências

- ANDERSON, J.T.; WILLIS, J.H; MITCHELL-OLDS, T. Evolutionary genetics of plant adaptation. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, p. 675–683, Dec. 2010.
- ARABNEZHAD, H.; BAHAR, M.; MOHAMMADI, H.R.; LATIFIAN, M. Development, characterization and use of microsatellite markers for germplasm analysis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 134, p. 150–156, Feb. 2012.
- AUDIGEOS D, BROUSSEAU L, TRAISSAC S, SCOTTI-SAINTAGNE C, SCOTTI I. Molecular divergence in tropical tree populations occupying environmental mosaics. **Journal of Evolutionary Biology**, Malden, v. 26, p. 529–544, Mar. 2013.
- BARLUENGA, M.; AUSTERLITZ, F.; ELZINGA, J.A.; TEIXEIRA, S.; GOUDET, J.; BERNASCONI, G. Fine-scale spatial genetic structure and gene dispersal in *Silene latifolia*. **Heredity**, London, v. 106, p.13–24, Jan. 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. 399p.
- CARVALHO, M.A.A.P. de; BEBELI, P.J.; BETTENCOURT, E.; COSTA, G.; DIAS, S.; SANTOS, T.M.M. dos; SLASKI, J.J. Cereal landraces genetic resources in worldwide GeneBanks. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 33, p. 177–203, Apr. 2013.
- CAVIGLIA-HARRIS, J.L.; SILLS, E.O. Land use and income diversification: comparing traditional and colonist populations in the Brazilian Amazon. **Agricultural Economics**, Malden, v. 32, p. 221–237, May 2005.
- CLEMENT, C.R.; CRISTO-ARAÚJO, M.; D’EECKENBRUGGE, G.C.; ALVES PEREIRA, A.; PICANÇO-RODRIGUES, D. Origin and domestication of native Amazonian crops. **Diversity**, Denton, v.2, p.72-106, 2010.

CLEMENT, C.R. Melhoramento de espécies nativas. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Eds). **Recursos genéticos e melhoramento - plantas**. Mato Grosso - Rondonópolis: Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso, 2001. p. 423-441.

COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequency. **Evolution**, Oxford, v.23, n.6, p. 72-84, Mar. 1969.

CORRÊA, C.E.; FISCHER, E.; SANTOS, F.A.M. dos. Seed banks on *Attalea phalerata* (Arecaceae) stems in the Pantanal wetland, Brazil. **Annals of Botany**, Oxford, v. 109, p. 729–734, Mar. 2012.

DAVEY, J.W.; HOHENLOHE, P.A.; ETTER, P.D.; BOONE, J.Q.; CATCHEN, J.M.; BLAXTER, M.L. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. **Nature Reviews: Genetics**, London, v. 12, p. 499-510, July 2011.
DIERINGER, D.; SCHLÖTTERER, C. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 167-169, Mar. 2003.

DIVA-GIS. 2012. User Manual, version 7.5 [en línea]. Disponível em: http://www.diva-gis.org/docs/DIVA-GIS_manual_7.pdf. Acesso em: 01 jun. 2013.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13–15, Jan. 1990.

EGLER, M.; EGLER, C.A.G.; FRANZ, B.; ARAUJO, M.S.M de; FREITAS, M.A.V. de. Indicators of deforestation in the Southern Brazilian Pre-Amazon. **Regional Environmental Change**, Heidelberg, v. 13, p. 263–271, Apr. 2013.

EGUIARTE, L.E.; PEREZ-NASSER, N.; PIÑERO, D. Genetic - structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum Mexicanum* (Tropical Palm): Implications for evolution and conservation. **Heredity**, London, v. 69, p. 217-228, Mar. 1992.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v.10, p. 564–567, Mar. 2010.

FEARNSIDE, P.M. Brazil's Balbina Dam: Environment versus the legacy of the Pharaohs in Amazonia. **Environmental Management**, New York, v. 13, p. 401-423, Aug. 1989.

FELSENSTEIN, J. **PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.69**. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, 2004. Disponível em: <<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>>. Acesso em: 20 jun. 2013.

FREELAND, J.R.; KIRK, H.; PETERSEN, S. **Molecular ecology**. 2.ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011, 449p.

FUTUYMA, D.J. **Evolution**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2005. 603p.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. *Princípios de genética de populações*. 4.ed., Porto Alegre: Artmed, 2010, 660p.

JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N.A. *CLUMPP*: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, p. 1801-1806, May. 2007.

JORGE, M.L.S.P.; HOWE, H.F. Can forest fragmentation disrupt a conditional mutualism? A case from central Amazon. **Oecologia**, Heidelberg, v. 161, p. 709–718, Oct. 2009.

KALINOWSKI, S.T. Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 5, p. 539–543, Aug. 2004.

KATZ, E.; LÓPEZ, C.L.; FLEURY, M.; MILLER, R.P.; PAYÊ, V.; DIAS, T.; SILVA, F.; OLIVEIRA, Z.; MOREIRA, E. No greens in the forest? Note on the limited consumption of greens in the Amazon. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, Warsaw, v. 81, p. 283–293, Dec. 2012.

KONAN, K.J.N.; KOFFI, KE.; KONAN, J.L.; LEBRUN, P.; DERY, S.K.; SANGARE, A. Microsatellite gene diversity in coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions resistant to lethal yellowing disease. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 6, p. 341-347, Feb. 2007.

KOTTEK, M., J. GRIESER, C. BECK, B. RUDOLF, AND F. RUBEL, 2006: World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. **Meteorologische Zeitschrift**, Stuttgart, v. 15, p. 259-263, June 2006.

KRISTIANSEN, T.; SVENNING, J.C.; EISERHARDT, W.L.; PEDERSEN, D.; BRIX, H.; KRISTIANSEN, S.M.; KNADEL, M.; GRÁNDEZ, C.; BALSLEV, H. Environment versus dispersal in the assembly of western Amazonian palm communities. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 39, p. 1318–1332, July 2012.

LEDUCQ, J.B.; LLAURENS, V.; CASTRIC, V.; SAUMITOU-LAPRADE, P.; HARDY, O.J.; VEKEMANS, X. Effect of balancing selection on spatial genetic structure within populations: theoretical investigations on the self-incompatibility locus and empirical studies in *Arabidopsis halleri*. **Heredity**, London, v. 106, p. 319–329, Feb. 2011.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data**. Version 1.0, 2001. Disponível em: <<http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php>>. Acesso em: 20 jun. 2010.

LIEBERMAN, M.; LIEBERMAN, D. Nearest-neighbor tree species combinations in tropical forest: the role of chance, and some consequences of high diversity. **Oikos**, Malden, v. 116, p. 377–386, Mar. 2007.

LIU, B.; SU, J.; CHEN, J.; CUI, G.; MA, J. Anthropogenic halo disturbances alter landscape and plant richness: a ripple effect. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, p. e56109, Feb. 2013.

LLERAS, E.; GIACOMETTI, D.C.; CORADIN, L. Áreas críticas de distribución de palmas en las Américas para colecta, evaluación y conservación. In: FAO. **Informe de la reunión de consulta sobre palmeras poco utilizadas de América Tropical**. Turrialba: FAO, 1983. p. 67-101.

LOPES, M.T.G.; MACÊDO, J.L.V.D.; LOPES, R.; LEEUWEN, J.V.; RAMOS, S.L.F.; BERNARDES. Domestication and breeding of the Tucum Palm. In: BORÉM, A.; LOPES, M.T.G.; CLEMENT, C.R.; NODA, H. (Eds). **Domestication and breeding: Amazonian species**. Viçosa, MG.: Universidade Federal de Viçosa, 2012 p. 421-436.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 27, p.209–220, Feb. 1967.

MIRANDA, I.P.A.; RABELO, A.; BUENO, C.R.; BARBOSA, E.M.; RIBEIRO, M.N.S. **Frutos de palmeiras da Amazônia**. Manaus: MCT/INPA, 2001. 120p.

NASS, L.L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L.L.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 29-56.

NAZARENO, A.G.; REIS, M.S. dos. At Risk of Population Decline? An Ecological and Genetic Approach to the Threatened Palm Species *Butia eriospatha* (Arecaceae) of Southern Brazil. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 105, p. 120-129, Jan. 2014.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Bethesda, v. 89, p. 583-590, July 1978.

NEI M, TAJIMA F, TATENO Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. **Journal Molecular Evolution**, New York, n.19, p. 153-170, Mar. 1983.

OLIVEIRA, M.S.P.D.; SANTOS, J.B.D.; AMORIM, E.P.; FERREIRA, D.F. Variabilidade genética entre acessos de açaizeiro utilizando marcadores microssatélites. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, p. 1253-1260. Sept. 2010.

OOSTERHOUT, C.V; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.4, p. 535–538, June 2004.

OOSTERHOUT, C.V; WEETMAN, D.; HUTCHINSON, W.F. **Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations**. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.6, p. 255–256, 2006.

OTTEWELL, K.; GREY, E.; CASTILLO, F.; KARUBIAN, J. The pollen dispersal kernel and mating system of an insect-pollinated tropical palm, *Oenocarpus bataua*. **Heredity**, London, v. 109, p. 332–339, Dec. 2012.

OUBORG, N.J.; PERTOLDI, C.; LOESCHCKE, V.; BIJLSMA, R.; HEDRICK, P.W. Conservation genetics in transition to conservation genomics. **Trends in Genetics**, Oxford, v. 26, p. 177–187, Apr. 2010.

PANNELL, J.R.; FIELDS, P.D. Evolution in subdivided plant populations: concepts, recent advances and future directions. **New Phytologist**, Oxford, v. 201, p. 417–432, Jan. 2014.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, p. 2537–2539, July 2012.

PICKERSGILL, B. Domestication of plants in the Americas: Insights from Mendelian and molecular genetics. **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, p. 925–940, Aug. 2007.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P.J. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Bethesda, v. 155, p. 945–959, June 2000.

RAMBAUT, A. **FigTree v1.3.1 2006-2009**. 2009. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>. Acesso em: 31 out. 2012.

RAMOS, S.L.F.; MACEDO, J.L.V.; LOPES, M.T.G.; BATISTA, J.S.; FORMIGA, K.M.; DA SILVA, P.P.; SAULO-MACHADO, A.C.; VEASEY, E.A. Microsatellite loci for tucumã of Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) and amplification in other Arecaceae. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 99, p. e508–e510, Dec. 2012.

RAMOS, S.L.F.; LOPES, M.T.G.; LOPES, R.; CUNHA, R.N.V. da; MACÊDO, J.L.V. de; CONTIM, L.A.S.; CLEMENT, C.R.; RODRIGUES, D.P.; BERNARDES, L.G. Determination of the mating system of Tucumã palm using microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 11, p. 181–185, June 2011a.

RAMOS, S.L.F.; MACÊDO, J.L.V. de; MARTINS, C.C.; LOPES, R.; LOPES, M.T.G. Tratamentos pré-germinativos e procedência de sementes do tucumã-do-Amazonas para a produção de mudas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, p. 962–969, Sep. 2011b.

RIBEIRO, F.E.; BAUDOUIN, L.; LEBRUN, P.; CHAVES, L.J.; BRONDAN, C.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R. Population structures of Brazilian tall coconut (*Cocos nucifera* L.) by microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, p. 696–702. Sep. 2010.

RICE, W.R. Analyzing tables of statistical test. **Evolution**, Oxford, v. 43, p. 223–225, Jan. 1989.

ROSENBERG, N.A. Distruct: a program for the graphical display of population structure. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 4, p. 137–138, June 2004.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Cary, v. 4, p. 406–425, July 1987.

SCARIOT, A. Forest fragmentation effects on palm diversity in Central Amazonia. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 87, p. 66–76, Feb. 1999.

SCHROTH, G.; MOTA, M.S.S.; LOPES, R.; FREITAS, A.F. Extractive use, management and in situ domestication of a weedy palm, *Astrocaryum tucuma*, in the Central Amazon. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 202, p. 161–179, July 2004.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, New York, v.18, p. 233–234, Feb. 2000.

SENA, J.A.; DEUS, L.A.B. DE; FREITAS, M.A.V.; COSTA, L. Extreme events of droughts and floods in Amazonia: 2005 and 2009. **Water Resources Management**, Dordrecht, v.26, p. 1665–1676, Jan. 2012.

SILVA, M.S.; VIEIRA, F.A.; CARVALHO, D. Diversity and genetic structure in natural population of *Geonoma schottian* Mart (ARECACEAE): implications for conservation. **Cerne**, Lavras, v. 17, p. 195-201, June 2011.

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

SMOUSE, P. E.; LONG, J. C.; SOKAL, R.R. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. **Systematic Zoology**, Oxford, v. 35, p. 627–632, Dec. 1986.

UHL, C.; CLARK, K.; CLARK, H.; MURPHY, P. Early plant succession after cutting and burning in the upper rio Negro region of the Amazon basin. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 69, p. 631-649, July 1981.

UHL, C. Restoration of degraded lands in the Amazon Basin. In: WILSON, E.O; PETER, F.M. (eds.) **Biodiversity**. Washington, DC: National Academy Press, 1988. p. 326-332.

VIEIRA, D.L.M.; SCARIOT, A. Principles of natural regeneration of tropical dry forests for restoration. **Restoration Ecology**, Hoboken, v. 14, p. 11–20, Mar. 2006.

WEIR, B.S. **Genetic data analysis II**. Sunderland: Sinauer Associates. 1996. 445p.

WEIR, B.S. Inferences about linkage disequilibrium. **Biometrics Bulletin**, Washington, v. 35, p. 235-254, Mar. 1979.

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

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

ZAKI, N.M.; SINGH, R.; ROSLI, R.; ISMAIL, I. *Elaeis oleifera* genomic-SSR markers: exploitation in oil palm germplasm diversity and cross-amplification in Arecaceae. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, p. 4069-4088, Mar. 2012.

4 DISPERSÃO DE PÓLEN, DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL EM POPULAÇÃO NATURAL DE *Astrocaryum aculeatum* NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Resumo

Astrocaryum aculeatum (Arecaceae) é uma espécie de ocorrência na Amazônia Ocidental e Central brasileira. Seu fruto é muito apreciado na região amazônica que consome a polpa na forma fresca. Sua produção é quase exclusivamente feita pelos agricultores extrativistas. Não há informações de como este extrativismo pode estar influenciando o nível de diversidade genética, fluxo gênico e estrutura genética espacial das suas populações e que estratégias seriam recomendadas para o uso deste recurso genético. Sob este enfoque, o objetivo desta pesquisa foi investigar como uma população de *A. aculeatum* da Amazônia brasileira é influenciada pelos impactos do extrativismo de frutos, utilizando análise paternidade e locos microssatélites. Mais especificamente, objetivou-se comparar a diversidade genética entre indivíduos adultos e sementes que seriam comercializados nos mercados da Amazônia, quantificar o fluxo e dispersão de pólen, a estrutura genética espacial, o coeficiente de coancestria e o tamanho efetivo de indivíduos adultos. O estudo foi realizado em uma população natural de *A. aculeatum* de aproximadamente 8 ha e isolada por 400 m de outras, localizada no Estado do Amazonas, Brasil. Nesta população foram mapeados e amostrados tecidos foliares de 112 plantas reprodutivas e 120 sementes (progênies) de 12 plantas matrizes. Os parâmetros de diversidade genética foram altos tanto para os genitores ($\bar{A} = 7,7$; $\bar{H}_O = 0,57$; $\bar{H}_E = 0,55$) como para as progênies ($\bar{A} = 6,4$; $\bar{H}_O = 0,59$; $\bar{H}_E = 0,56$). O número de alelos exclusivos foi maior nos adultos. Os índices de fixação para adultos ($f_a = -0,035$) e progênies ($f_p = -0,060$) foram negativos e não significativos. Foi detectada estrutura genética espacial significativa para os adultos até a distância de 50 m, indicando dispersão de sementes a curtas distâncias. A análise de paternidade detectou 9,2% de imigração de pólen. Não foram detectadas autofecundações e a distância média de polinização dentro da população foi de 81 m. A área média de polinização efetiva na vizinhança foi de 1,51 ha. Os resultados indicam substancial entrada de alelos na população via imigração de pólen, o que contribui para a manutenção da diversidade genética da população. A renovação com novas progênies selecionadas deve ser realizada a partir de um espaçamento mínimo de 50 m entre plantas matrizes para evitar coletar sementes de plantas parentes.

Palavras chave: Arecaceae; Microssatélites; Tucumã-do-Amazonas; Fluxo gênico; Diversidade genética; Análise de paternidade; Estrutura genética espacial; Coeficiente de coancestria; Tamanho efetivo.

Abstract

Astrocaryum aculeatum (Arecaceae) is a species occurring in Central and Western Brazilian Amazon. Its fruit is widely appreciated in the Amazon region that consumes the pulp in fresh form. Its production is almost exclusively made by extractive farmers. There is no information on how this extrativism may be influencing the level of genetic diversity, gene flow, spatial genetic structure of their populations and what strategies would be recommended for the use of this genetic resource. Under this approach, the objective of this research was to investigate on how a population of *A. aculeatum* of the Brazilian Amazon is influenced by the

impacts of fruit extrativism using paternity analysis and microsatellite loci. More specifically, the objective was to compare the genetic diversity among adults and seeds that would be commercialized in the markets of the Amazon, quantify the gene flow and pollen dispersal, the spatial genetic structure, the coefficient of coancestry and the effective size of adults. The study was carried out in a natural population of *A. aculeatum* of approximately 8 ha and isolated by 400 m of the nearest population in the State of Amazonas, Brazil. In this population we mapped 112 possible progenitors, 12 matrices and 120 progenies. The parameters of genetic diversity were high for both the parents ($\bar{A}=7.7$; $\bar{H}_O=0.57$; $\bar{H}_E=0.55$) and the offspring ($\bar{A}=6.4$; $\bar{H}_O=0.59$; e $\bar{H}_E=0.56$). The number of the exclusive alleles was greater for the parents. The fixation indexes for adults ($f_a=-0.035$) and offspring ($f_p=-0.060$) were negative and not significant. A significant spatial genetic structure for adult trees was detected up to the distance of 50 m, indicating seed dispersal across a short distance. Paternity analysis detected 9.2% of pollen immigration. Selfing was not detected and the average distance of pollination within the population was 81 m. The average area of effective pollination in the neighborhood was 1.51 ha. The results indicate substantial input of alleles in the population through pollen immigration, contributing to the maintenance of genetic diversity of the population. The renovation with new selected offspring should be made from a minimum spacing of 50 m between matrices to prevent collecting seeds from plant relatives.

Keywords: Areaceae; Microsatellite; Tucumã-do-Amazonas; Gene flow; Genetic diversity; Paternity analysis; Spatial genetic structure; Coancestry coefficient; Effective size

4.1 Introdução

As palmeiras são relatadas como um dos grupos de plantas mais úteis ou importantes ao homem, especialmente para as comunidades rurais, pois sempre forneceram materiais de construção, tecidos, combustível, alimentos, plantas ornamentais e medicamentos (SOSNOWSKA; BALSLEV, 2009). Na floresta tropical da Amazônia brasileira encontra-se a palmeira nativa *Astrocaryum aculeatum*, da família Areaceae, conhecida popularmente como *A. aculeatum*, de significativa importância econômica e social para o estado do Amazonas (KAHN; GRANVILLE, 1992), devido ao fato de que o fruto do *A. aculeatum* é muito apreciado pela população da região amazônica que consome a polpa na forma fresca e das sementes e polpa podem ser extraídos óleos para uso na alimentação humana e indústria de cosméticos, sendo que o endocarpo é usado no artesanato (RAMOS et al., 2011a; LOPES et al., 2012). Esta espécie é adaptada a ecossistemas de terra firme e ocorre mais comumente em áreas desmatadas ou que sofreram alguma ação antrópica (MIRANDA et al., 2001; RAMOS et al., 2011a). Tem ocorrência circunscrita à Amazônia Ocidental e Central brasileira, especificamente nos estados do Acre, Mato Grosso, Rondônia, Roraima, parte do Pará

(LOPES et al., 2012) e Amazonas, sendo este último seu provável centro de diversidade genética mais importante (LLERAS; GIACOMETTI; CORADIN, 1983).

Entretanto, a produção disponível é quase que exclusivamente obtida pelas explorações extrativistas, apresentando à população ofertas irregulares tanto em quantidade como em qualidade. A demanda crescente no mercado e o bom preço pago pelos frutos têm motivado o plantio desta espécie pelos agricultores da região de Manaus e próximo a elas, no estado do Amazonas, mas não existe disponibilidade de material selecionado para o estabelecimento dos plantios. Assim a identificação e seleção fenotípica dos indivíduos superiores nas populações naturais de *A. aculeatum* é importante para o melhoramento da espécie (LOPES et al., 2012). Entretanto, além de informações morfoagronômicas, o emprego do marcador molecular microssatélites, que se caracteriza por ser um marcador co-dominante, de relativa abundância, extensa cobertura do genoma (incluindo o genoma de organelas), de elevada diversidade alélica, apresentando reprodutibilidade, de fácil genotipagem, entre outras características (KALIA et al., 2011), pode auxiliar no estudo do *A. aculeatum*, permitindo medir o grau de polimorfismo em uma ou mais populações de indivíduos, dando resposta a questões importantes em estudos de genética populacional e abordagens ecológicas e evolutivas (DAVEY et al., 2011), assim como estimar a diversidade genética, endogamia, estrutura populacional espacial, sistema de reprodução e fluxo gênico (OUBORG et al., 2010).

O fluxo gênico de árvores envolve tanto a dispersão por pólen como a de sementes (GODOY; JORDANO, 2001; SMOUSE; SORK, 2004), sendo que os gametas masculinos são dispersos via pólen e os embriões contendo contribuições de ambos os pais são dispersas sob a forma de sementes (HAMRICK; MURAWSKI; NASON, 1993). Padrões de dispersão de pólen e sementes influenciam muito a estrutura genética e o tamanho efetivo das populações de plantas (ADAMS, 1992; DOW; ASHLEY, 1998; SOUSA; HATTEMER, 2003). Altos níveis de fluxo gênico são importantes para manter a coesão genética entre as populações, enquanto que níveis baixos produzem diferenciação genética através de deriva genética e seleção local (BITTENCOURT; SEBBENN, 2007).

O extrativismo de frutos do *A. aculeatum* pode estar afetando as populações levando a uma perda de alelos por migração a cada produção de frutos, o que poderia estar associada com uma redução no tamanho efetivo da população. Quando o sistema de reprodução é alterado e o fluxo gênico interrompidos pode ocorrer o aumento da endogamia e da divergência genética entre populações (JUMP; PEÑUELAS, 2006). Assim, o conhecimento dos parâmetros de diversidade, sistema de reprodução, fluxo gênico, dispersão do pólen e

estrutura genética espacial em populações naturais de *A. aculeatum* são fundamentais para o estabelecimento de estratégias adequadas no uso deste recurso genético, permitindo direcionar possíveis cruzamentos, aumentar a eficiência da domesticação e seleção nas etapas de um programa de melhoramento genético da espécie. A produção extrativista, que é praticada para a espécie, pode estar afetando a estrutura populacional, a diversidade genética e a dispersão das sementes. No entanto, a longevidade das árvores, combinado com a produção de sementes e uma eficaz dispersão do pólen, pode aumentar a resistência aos efeitos negativos do extrativismo no *A. aculeatum*.

O objetivo desta pesquisa foi investigar como uma população de *A. aculeatum* da Amazônia brasileira é influenciada pelos impactos do extrativismo de frutos, utilizando análise paternidade e locos microssatélites. Mais especificamente, objetivou-se comparar a diversidade genética entre indivíduos adultos e sementes que seriam comercializados nos mercados da Amazônia), quantificar o fluxo e dispersão de pólen, a estrutura genética espacial, o coeficiente de coancestria e o tamanho efetivo de indivíduos adultos.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Área de estudo

Este estudo foi realizado numa população natural de *A. aculeatum*, localizada no lote 12, do Projeto Fundiário Manaus, nomeada de propriedade Najatuba, no município de Manaus, Amazonas, Brasil (Figura 4.1). Esta população está localizada na latitude 02°53'27,9"S, e longitude -60°06'08,2"O e se encontra distribuída geograficamente no tipo de clima Af, de acordo com o mapa mundial de classificação climática de Köppen-Geiger (KOTTEK et al., 2006). É delimitada geograficamente pelo ponto cardeal leste com a bacia hidrográfica do igarapé Tarumã-Açú. Pelo lado oeste da população, está localizada uma floresta de vegetação natural de mais de 3000 m de extensão nesta direção, que faz parte da reserva legal que se encontra dentro da propriedade Najatuba e das outras propriedades dentro do Projeto Fundiário Manaus. No ponto cardeal norte a população está limitada pela bacia hidrográfica do igarapé Cuieiras, que apresenta uma mata ciliar de mais de 200 m para ambos os lados da bacia hidrográfica. O lado sul da população é limitado pelo igarapé do Jacaré, que apresenta uma mata ciliar de mais de 200 m para o lado da população em estudo e mais de 800 m para o outro da bacia hidrográfica. Estas informações mostram o grau de isolamento da população, tendo em consideração que a população natural mais próxima se encontra a mais de 400 m pelo ponto cardeal norte e a mais de 1000 m pelo ponto cardeal sul, e como mencionado, em outras direções dos pontos cardiais e suas subdivisões ela apresenta mais de

3000 m para chegar a outras populações de *A. aculeatum*. As plantas que formam esta população são utilizadas para fornecer os frutos de *A. aculeatum* para o mercado de Manaus através da exploração extrativista da espécie. Esta população também faz parte do plano de conservação *in situ* de materiais superiores, pela Embrapa Amazônia Ocidental através do projeto “Pesquisa, desenvolvimento e inovação em palmáceas para a produção de óleo e aproveitamento econômico de co-produtos e resíduos – PROPALMA” (Embrapa- Propalma).

4.2.2 Amostragem

Na área da população natural foram identificadas 16 plantas matrizes, com a presença de cachos com frutos em processo de maturação, nas quais foram coletadas as sementes para este estudo. No mês de março de 2011, no pico de frutificação de *A. aculeatum* (LOPES et al., 2012), 25 frutos foram coletados de cada matriz. Estes foram embalados em sacos de polietileno, identificados por matriz e transportados para o Laboratório de Sementes de Dendê da Embrapa Amazônia Ocidental, localizado na Rodovia AM-10, km 29, zona rural de Manaus. Foi retirada a polpa de todos os frutos, e os pirênios foram colocados à secagem em estufas com circulação forçada de ar, regulada para 30°C, até que a amêndoa (semente) pudesse se desprender do tegumento, alcançando um grau médio de umidade de 14,5% (RAMOS et al., 2009, 2011a). O processo de embebição e germinação foi realizado seguindo as orientações de Ramos et al. (2009, 2011a), etapa que foi realizada em três meses de avaliação. Foram obtidas um total de 120 plântulas (progênies) provenientes de 12 matrizes, sendo que quatro matrizes (16, 19, 36 e 38) não apresentaram plântulas após os três meses na casa de vegetação (Tabela 4.1). A distância entre as matrizes doadoras dos frutos variou de 6,2 a 83,2 m. (média de 37,7 m e mediana de 37,1 m).

Tabela 4.1 - Matrizes mostrando o numero de progênies obtidas após o processo de germinação e emergência de *Astrocaryum aculeatum*

Matriz	NPG	Matriz	NPG	Matriz	NPG	Matriz	NPG
04	15	15	10	37	8	45	13
05	2	16	0	38	0	47	2
06	7	19	0	40	8	48	14
07	14	36	0	41	15	49	12

NPG=número de progênies obtidas após a germinação.

Baseado no agrupamento das matrizes, pela sua proximidade umas das outras, foram realizados quatro transectos, com um ponto de partida em um centro imaginário entre o agrupamento das matrizes. O final de cada transecto foi determinado quando não existissem

mais plantas numa faixa mínima de 100 m. Cada transecto apresentava uma largura de 10 metros. Estes transectos foram distribuídos para o nordeste, sudeste, noroeste e sudoeste a partir do centro, sendo que no total dos quatro transectos foram identificados 108 possíveis árvores doadoras de polen. A distância entre as árvores variou de 0,5 a 351,4 m (média de 89,6 m e mediana de 78,9 m). A posição geográfica de cada genitor masculino e feminino foi registrada por meio do equipamento GPS (sistema de posicionamento global).

Das 244 amostras obtidas, provenientes das 12 matrizes e de suas 120 progênies, das quatro matrizes sem progênies e das demais 108 plantas amostradas foi coletado um folíolo e armazenado em um saco plástico tipo *zip lock* previamente identificado, contendo sílica gel, até que pudessem ser conservados a -20° C no Laboratório Temático de Biologia Molecular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LTBM - INPA). O DNA total foi extraído de acordo com o protocolo do detergente catiônico CTAB 2X (Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide) descrito por Doyle e Doyle (1990). Detalhes da metodologia utilizada para extração, assim como da quantificação de DNA encontra-se no Capítulo 3.

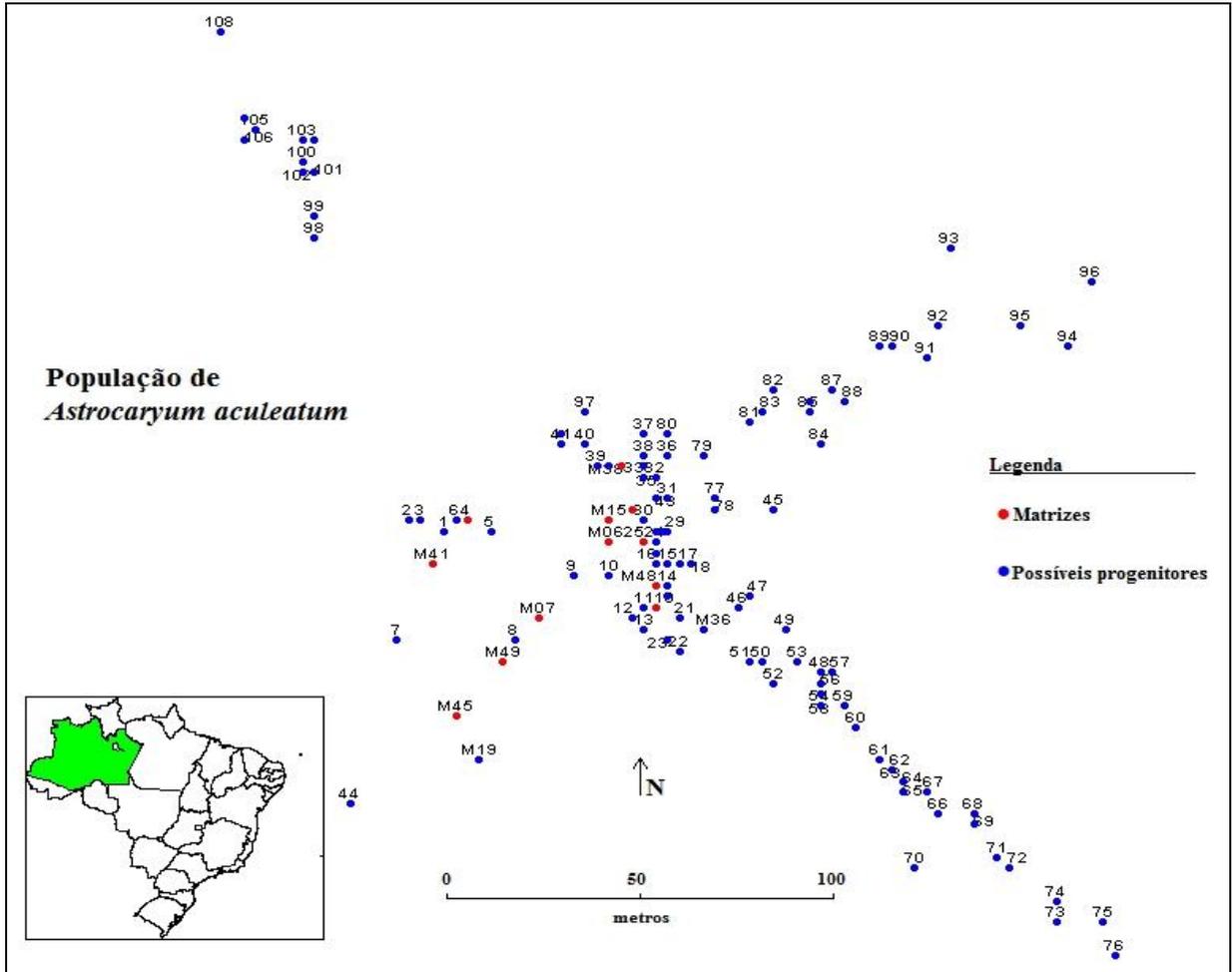


Figura 4.1 - Local de coleta de uma população natural da espécie *Astrocarylum aculeatum*, na propriedade Najatuba, em Manaus, AM, Brasil. Mapa criado por S.L.F. Ramos, utilizando o programa DIVA-GIS v. 7.5 (DIVA-GIS, 2012).

4.2.3 Amplificação dos microssatélites no DNA de *Astrocarylum aculeatum*

Foram utilizados neste estudo 12 locos de microssatélites desenvolvidos para *A. aculeatum* (RAMOS et al., 2012). Estes iniciadores contendo os fragmentos de microssatélites foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em um volume total de 10 μL , contendo 10 ng de DNA genômico, 1X buffer, 210 μM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl_2 , 0,16 μM de *primer forward* e calda M13 (FAM ou NED) (SCHUELKE, 2000), 0,32 μM de *primer reverse*, 1,05 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) e 3,49 μL de água ultra pura. Estas amplificações via PCR foram desenvolvidas em duas etapas, a primeira etapa é específica para os iniciadores e a segunda para realizar a ligação do M13. A primeira etapa inicia estabilizando a temperatura a 68° C por 2 minutos e a 92° C por 30 segundos, e em seguida são realizados 30 ciclos do processo de desnaturação a 92° C por 30 segundos, seguido do anelamento por 35 s (temperaturas de cada iniciador descritas na Tabela

2.2) e a extensão a 68° C ou 72° C por 35 segundos. Na segunda etapa do M13 foram realizados 15 ciclos do processo de desnaturação a 92° C por 20 segundos, seguido do anelamento a 53° C por 30 segundos e da extensão a 72° C por 30 segundos, finalizando com uma extensão a 72° C por 15 minutos seguida de 68° C por 30 minutos (RAMOS et al., 2011b, 2012). As amostras foram amplificadas usando o termociclador *Veriti* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

Foi realizada a eletroforese com gel de agarose a 1,5% por 90 minutos sob corrente de 80V. Os produtos da PCR de boa qualidade foram submetidos à eletroforese capilar no Analisador automático de DNA ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) para determinar os tamanhos dos alelos com o auxílio do marcador com tamanhos de fragmentos conhecidos, ET-550 ROX *size standard* (GE Healthcare, Amersham, Buckinghamshire, UK). As genotipagens foram observadas e analisadas com o auxílio do programa GENEMAPPER v4.0 *software* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

4.2.4 Análise estatística

4.2.4.1 Diversidade genética e índice de fixação

A diversidade genética foi determinada a fim de comparar os adultos (n= 124 indivíduos) com as progênes (n= 120 indivíduos). Os parâmetros estimados foram o número total de alelos (k), número de alelos exclusivos em cada geração (A_p), heterozigiosidade observada (H_O), heterozigiosidade esperada (H_E) e o índice de fixação (f) para adultos e progênes. Com exceção do índice f , os demais parâmetros foram estimados utilizando o programa *Genetic Data Analysis - GDA* (LEWIS; ZAYKIN, 2001). Para verificar se o índice f era estatisticamente diferente de zero foi utilizado 1,000 permutações de Monte Carlo (alelos entre os indivíduos) e uma correção de *Bonferroni* (95%, $\alpha= 0,05$) implementada no programa SPAGeDI versão 1.3 (HARDY; VEKEMANS, 2002). Para comparar os valores médios de A , A_p , H_O e H_E entre árvores adultas e progênes foi utilizado o teste *t-student*.

4.2.4.2 Análise da estrutura genética espacial

A estrutura genética espacial (EGE) foi estudada utilizando a estimativa do coeficiente de coancestria médio (θ_{xy}) entre os pares de plantas adultas. O coeficiente θ_{xy} foi calculado utilizando o programa SPAGeDI (HARDY; VEKEMANS, 2002). Para visualizar a EGE, valores de θ_{xy} foram calculados sobre um conjunto de classes de distância e, em seguida, plotados em comparação com as distâncias, de acordo com Loiselle et al. (1995). Utilizou-se

10 intervalos de distância que foram definidos pelo próprio programa, sendo que no último intervalo a distância máxima foi de 351 m (a distância máxima que deu uma boa representação de pares de indivíduos para cada uma das amostras) em cada análise. Para testar se a EGE desviou significativamente a partir de uma estrutura aleatória, o IC de 95% foi calculado para cada valor observado e cada classe de distância a partir de 10.000 permutações de indivíduos entre os locais.

Para avaliar a EGE foi realizada a medição do grau de EGE na primeira classe (0-21 m) dentro da distância de 0-351m. Esta medição é conhecida como estatística S_p (VEKEMANS; HARDY, 2004). Esta foi calculada como $-b_k/(1-\theta_l)$, onde θ_l é a média do coeficiente de coancestria par a par calculada entre todos os indivíduos dentro da primeira classe de distância (0-21m) e b_k é o declive da regressão do coeficiente de coancestria em função do logaritmo da distância espacial (0-351m). Para testar a EGE, a posição espacial dos indivíduos foi permutada (10.000 vezes) para se obter a frequência de distribuição de b_k sob a hipótese nula de que θ_l e $\ln(d_{xy})$ eram não correlacionados.

4.2.4.3 As estimativas de coancestria do grupo e tamanho efetivo da população

A coancestria de grupo (LINDGREN; MULLIN, 1998) foi estimada para as plantas adultas com o coeficiente médio de coancestria entre todos os pares de indivíduos (Θ) (1), usando o estimador J Nason (LOISELLE et al., 1995) pelo programa SPAGeDI (HARDY; VEKEMANS, 2002).

$$\Theta = \frac{0.5n(1+F_p) + \sum_{i=1}^n \sum_{j \neq i}^n \theta_{xy}}{n^2} \quad (1)$$

em que n é o número de indivíduos amostrados, F_p é o coeficiente de endogamia para a população e θ_{xy} é o coeficiente de coancestria entre pares de indivíduos x e y (LINDGREN; MULLIN, 1998). O tamanho efetivo da população foi calculado a partir de Θ como $N_e = 0,5/\Theta$ (COCKERHAM, 1969). Finalmente, a relação entre o tamanho efetivo da população (N_e) e o tamanho da população ($n=N$) (N_e/N) foi calculada (VEKEMANS; HARDY, 2004).

4.2.4.4 Análises do fluxo e dispersão do pólen

Para a análise de paternidade foi utilizado o programa CERVUS 3.0.3 (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007), com base em um método categórico de máxima verossimilhança. A paternidade das sementes foi determinada pela estatística Δ , estimada para os valores críticos de Δ foram calculados por meio de simulações no CERVUS

3.0, considerando 10.000 repetições (simulado para as progênies) com uma proporção de erros nos locos de zero (0,00). Todas as 124 palmeiras reprodutivas foram utilizadas como candidatos a pais das sementes. Assumiu-se que 60% dos parentes paternos poderiam estar fora da população.

Finalmente, adotou-se um nível de confiança de 80% e 95%, relaxado e rigoroso, respectivamente, no cálculo de paternidade (MARSHALL et al., 1998). Consideramos também a possível ocorrência de autofecundação. Para as estatísticas Δ , se um pai candidato de uma semente (progênie) tem um Δ calculado superior a um valor crítico Δ_c , considerou-se este indivíduo como o verdadeiro pai da semente. A taxa de autopolinização (s) foi calculada como o número de progênies autopolinizadas (n_{selfed}) dividido pelo número total de progênies na amostra (n). O fluxo gênico crítico foi estimado por $C_{gf} = 1 - (1 - P_{nsxcl})^p$ (DOW; ASHLEY, 1996). A taxa de imigração de pólen ($n_{immigrant}$) dentro da área foi estimada como sendo o número de progênies para as quais um pai não foi atribuído no interior da área amostrada, dividido pelo número total de progênies da amostra ($n=120$). Como cada palmeira na população (na área de estudo) foi mapeada, a distância de dispersão de pólen foi calculada para cada progênie como a distância entre as árvores de sementes e o doador de pólen putativo. Para estimar a distância espacial entre todos os pares de plantas foi utilizado a distância euclidiana entre dois pontos. Para verificar se os padrões de reprodução eram em função da distância entre as planta, comparou-se a curva de frequência de dispersão de pólen com a distância espacial entre todas as plantas, utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov (SOKAL; ROHLF, 1995). A área de polinização efetiva na vizinhança (\hat{A}_{ep}) foi calculada assumindo uma área circular em torno de uma árvore de semente (progenitora) central pela $\hat{A}_{ep} = 2\pi\hat{\sigma}_p^2$ (LEVIN, 1988), onde $\hat{\sigma}_p^2$ é a variância axial da dispersão de pólen. A área de polinização efetiva na vizinhança corresponde à área em que 63% dos doadores de pólen que acasalaram com uma árvore de semente são esperados de serem localizados (LEVIN, 1988).

4.3 Resultados

4.3.1 Diversidade genética

Dos 12 locos de microssatélite utilizados, os locos Aac01 e Aac13 apresentaram monomorfismo para as plantas selecionadas. Foram identificados um total de 81 alelos nos dez locos polimórficos, distribuídos nas 244 plantas compostas por adultos (mães e possíveis genitores) e progênies. O número de alelos por loco variou de 3 a 19, com uma média de 8,1. Nas plantas adultas, o número de alelos por loco variou de 3 a 19, apresentando mais alelos

($A=77$) que a prole ($A=64$), sendo que nas progênies o número de alelos por loco variou de 2 a 14 (Tabela 4.2). Destacar que esta informação foi obtida de uma amostragem com um número de descendentes ($n=118$, em média) quase que com o mesmo número de indivíduos que os adultos ($n=122$, em média) (Tabela 4.2). A análise também mostrou mais alelos exclusivos para os adultos do que para a prole (17 e 4, respectivamente), o que sugere uma baixa imigração de pólen de outras áreas, ou que as populações de tucumã são aparentemente recém formadas, apresentando assim alelos semelhantes em populações próximas. Porém, a presença de alelos exclusivos nas progênies indica a migração de alelos de outras populações.

Embora o número médio de alelos por loco tenha sido menor nos descendentes, a média da heterozigosidade observada e esperada nos adultos ($\bar{A}=7,7$; $\bar{H}_O=0,57$; e $\bar{H}_E=0,55$) apresentou valores menores que os dos descendentes ($\bar{A}=6,4$; $\bar{H}_O=0,59$; e $\bar{H}_E=0,56$) (Tabela 4.2). O índice de fixação foi negativo na maioria dos locos, e quando positivo variou para os adultos entre 0,06 e 0,21, e de 0,14 a 0,31 para as progênies. Entretanto, a média do índice de fixação para os adultos ($f_a=-0,035$) e progênies ($f_p=-0,060$) foi negativa e não foram significativamente diferentes de zero em todas as amostras (Tabela 4.2), o que indica que não há endogamia e nem excesso de heterozigotos

Tabela 4.2 - Diversidade genética e índice de fixação de palmeiras adultas e progênies de *Astrocaryum aculeatum*, em uma população de produção extrativista. A é o número de alelos, A_p é o número de alelos exclusivos em cada geração; H_E e H_O são as heterozigosidades esperada e observada; f_A e f_p são os índices de fixação para adultos e progênies; P_{Exc2} é a probabilidade teórica de não exclusão combinado para o par de genitores

Loco	Adultos						Progênies				
	N	$k(A_p)$	H_E	H_O	f_a	P_{Exc2}	n	$k(A_p)$	H_E	H_O	f_p
Aac02	124	3(1)	0,2445	0,2823	-0,1551	0,858	120	2	0,0954	0,1000	-0,0485
Aac03	124	3	0,2099	0,2258	-0,0761	0,741	120	3	0,4733	0,7083	-0,4996
Aac04	120	19(5)	0,8185	0,8583	-0,0489	0,153	120	14	0,8128	0,8417	-0,0356
Aac06	122	10(3)	0,7476	0,5902	0,2112	0,356	113	7	0,6471	0,5044	0,2213
Aac07	124	7(3)	0,6611	0,6210	0,0609	0,439	120	4	0,6565	0,7250	-0,1049
Aac09	123	15(3)	0,6680	0,5285	0,2096	0,285	119	12	0,7120	0,6134	0,1389
Aac10	123	4	0,5006	0,7236	-0,4481	0,664	120	6(2)	0,4858	0,7500	-0,5472
Aac11	122	4	0,3582	0,3607	-0,0068	0,606	118	5(1)	0,4794	0,3305	0,3115
Aac12	123	7(1)	0,6960	0,9919	-0,4277	0,343	120	6	0,6744	0,9750	-0,4484
Aac14	122	5(1)	0,5636	0,4754	0,1569	0,594	108	5(1)	0,5664	0,3889	0,3144
Média	122,7	7,70 ^{ns}	0,5468 ^{ns}	0,5658 ^{ns}	-0,0348 ^{ns}		118	6,40 ^{ns}	0,5603 ^{ns}	0,5937 ^{ns}	-0,0599 ^{ns}
Total		77(17)				0,00035427		64(4)			

^{ns}= Não significativo pelo teste *t-student* com p (probabilidade). A ns, $p=0,540$; H_E ns, $p=0,885$; H_O ns, $p=0,809$; f_a, f_p ns pela $p=0,447$ assim como estes não são diferentes de zero o que indica que não tem endogamia e nem excesso de heterozigotos.

4.3.2 Análise da estrutura genética espacial (EGE)

A estrutura genética espacial foi significativa até a distância de 50 m (Figura 4.2). A diminuição para valores negativos dos níveis de θ_{xy} é observada a mais de 78 m de distância. Os níveis de θ_{xy} foram significativamente mais baixos do que o limite inferior do IC de 95% para as classes de distâncias entre 95 e 351 m. Porém, as classes de distâncias entre 135 e 150m estavam dentro dos valores negativos dos níveis de θ_{xy} e do limite inferior do IC de 95%.

O valor médio de θ_{xy} para todos os pares de árvores adultas dentro da primeira classe de distância (0-21m) foi $\theta_{xy}=0,0224$. A inclinação da regressão b_k do coeficiente de coancestria par a par sobre o logaritmo da escala da distância espacial (0-351m) foi significativamente negativa ($b_k= -0.0135947$), mostrando um padrão de dispersão de sementes de disolamento por distância. A intensidade da EGE, medida pelo S_p , foi de 0,0139.

4.3.3 Coancestria e tamanho efetivo da população

O coeficiente de coancestria de grupo (Θ) formado entre todos os pares de árvores adultas foi de 0,023. Assumindo cruzamentos aleatórios, isso indica que a taxa esperada de cruzamentos endogâmicos é muito baixa (<3%). O tamanho efetivo estimado da população reprodutiva indica que as 124 plantas adultas correspondem a 22 indivíduos não parentes e endogâmicos ($N_e/N = 0,18$).

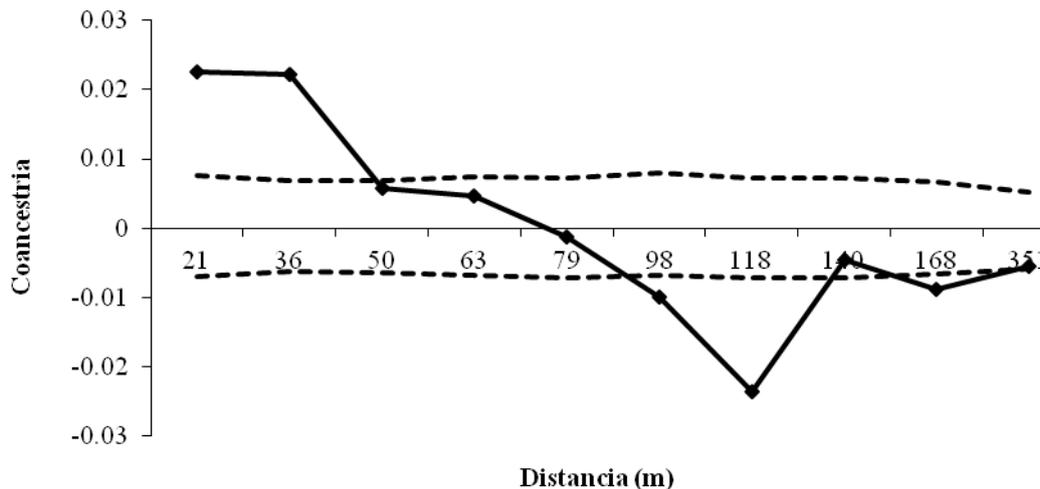


Figura 4.2 - Correlograma do coeficiente de coancestria médio (θ_{xy}) de genitores (plantas adultas) de uma população de *Astrocaryum aculeatum* para 10 classes de distância máxima (para cada intervalo) que foram definidos pelo programa SPAGeDI (HARDY; VEKEMANS, 2002). A linha contínua representa o valor médio de θ_{xy} . As linhas tracejadas representam o intervalo de confiança "IC" de 95% (de duas caudas) da distribuição média de θ_{xy} calculada a partir de 10 000 permutações de distância espacial entre os pares de plantas adultas amostradas

4.3.4 Análise de paternidade, padrões de fluxo e de dispersão do pólen

Como a probabilidade combinada de não-exclusão de pares de parentes (Tabela 4.2) foi baixa [$\Pr(Ex_2) = 0,00035427$], a estimativa do o fluxo gênico crítico teórico foi igualmente baixa (<5%, [$0,043 = 1 - (1 - 0,00035427)^{124}$]), mostrando que a estimativa de fluxo de pólen é robusta. Assim, da amostra de 120 progênies, teoricamente apenas 11 poderiam ter sido determinadas como tendo o pai dentro da população amostrada, quando na realidade eles estariam fora da população. Assim, as outras 11 progênies foram provavelmente originadas de pais de fora da nossa área de estudo, o que sugere uma imigração de pólen de 9,2% (Tabela 4.3). As 109 progênies foram aparentemente geradas por 56,4% das árvores adultas (70 das 124 árvores reprodutivas) (Figura 4.3). A taxa de autopolinização (s) foi zero para todas as progênies.

A distância de dispersão de pólen (δ) variou de 3 a 194 m, com média de 81 m (49 m de desvio padrão) e mediana de 70 m (Figura 4.4). Na área de estudo, 48% do pólen foi disperso entre as distâncias de 40 e 80 m. A estimativa do coeficiente de correlação entre o número de progênies fertilizadas pelos doadores de pólen e as distâncias entre as plantas matrizes foi negativamente alta e significativamente maior do que zero ($R^2=0,74$, $P<0,05$), sugerindo a distância entre plantas determinou os cruzamentos. O teste de Kolmogorov-Smirnov não foi significativo ($D= 0,06412$, $p=0,82$; Figura 4.4), o que indica que a distância espacial entre as árvores explica o padrão observado na dispersão de pólen. A área média de polinização efetiva na vizinhança foi de 1,51 ha, apresentando um raio da área média de polinização efetiva na vizinhança de 69 m.

Tabela 4.3 – Dispersão do pólen e migração dentro de famílias avaliadas por meio de análise de paternidade de uma população de *Astrocaryum aculeatum*

Matrizes	M04	M05	M06	M07	M15	M37	M40	M41	M45	M47	M48	M49	Total
Np	15	2	7	14	10	8	8	15	13	2	14	12	120
Nm	1	-	3	-	2	1	1	-	-	-	1	2	11
%m	6,7	0	42,8	0	20	12,5	12,5	0	0	0	7,1	16,7	9,2

Np= número de progênies; Nm=número de migrantes, %m= % de migrantes.

4.4 Discussão

4.4.1 Diversidade genética

Esta pesquisa constitui, para o *A. aculeatum*, o primeiro estudo para tentar entender o fluxo gênico desta espécie numa população natural espontânea e utilizada no extrativismo para suprir o mercado de Manaus no estado do Amazonas. Os resultados mostraram que para estas progenies estudadas, a atividade extrativista para a produção de frutos de *A. aculeatum* não está tendo um impacto negativo sobre a diversidade genética na prole de *A. aculeatum*, devido ao fato de que estas progenies apresentaram uma alta diversidade genética. Podendo-se destacar um alto conteúdo de informação genética observada pelo número médio de alelos por loco em genitores (7,7) e progênies (6,4), que não foi significativamente diferente entre adultos e genitores. Resultados similares, com maior número de alelos nos genitores e menor nas progênies foi observado em *Swietenia humilis* (ROSAS et al., 2011), *Copaifera langsdorffii* (SEBBENN et al., 2011) e *Hymenaea courbaril* (CARNEIRO et al., 2011). Entretanto, do ponto de vista da genética de populações os valores encontrados com relação ao número médio de alelos por loco para os genitores e progênies de *A. aculeatum* são superiores quando comparados com outros estudos sobre populações de palmeiras. Por exemplo, utilizando 13 locos microssatélites na espécie *Cocos nucifera* L. (coco) no Brasil foi encontrada uma média de 5,2 alelos por loco (RIBEIRO et al., 2010) e quando avaliados 21 genótipos de três acessos de coco com 13 locos microssatélites foi detectado uma média de 4,83 alelos por loco (KONAN et al., 2007). Em um estudo com sete locos microssatélites em acessos da espécie *Euterpe oleracea* Mart. foi encontrado uma média de 6,0 alelos por loco (OLIVEIRA et al., 2010).

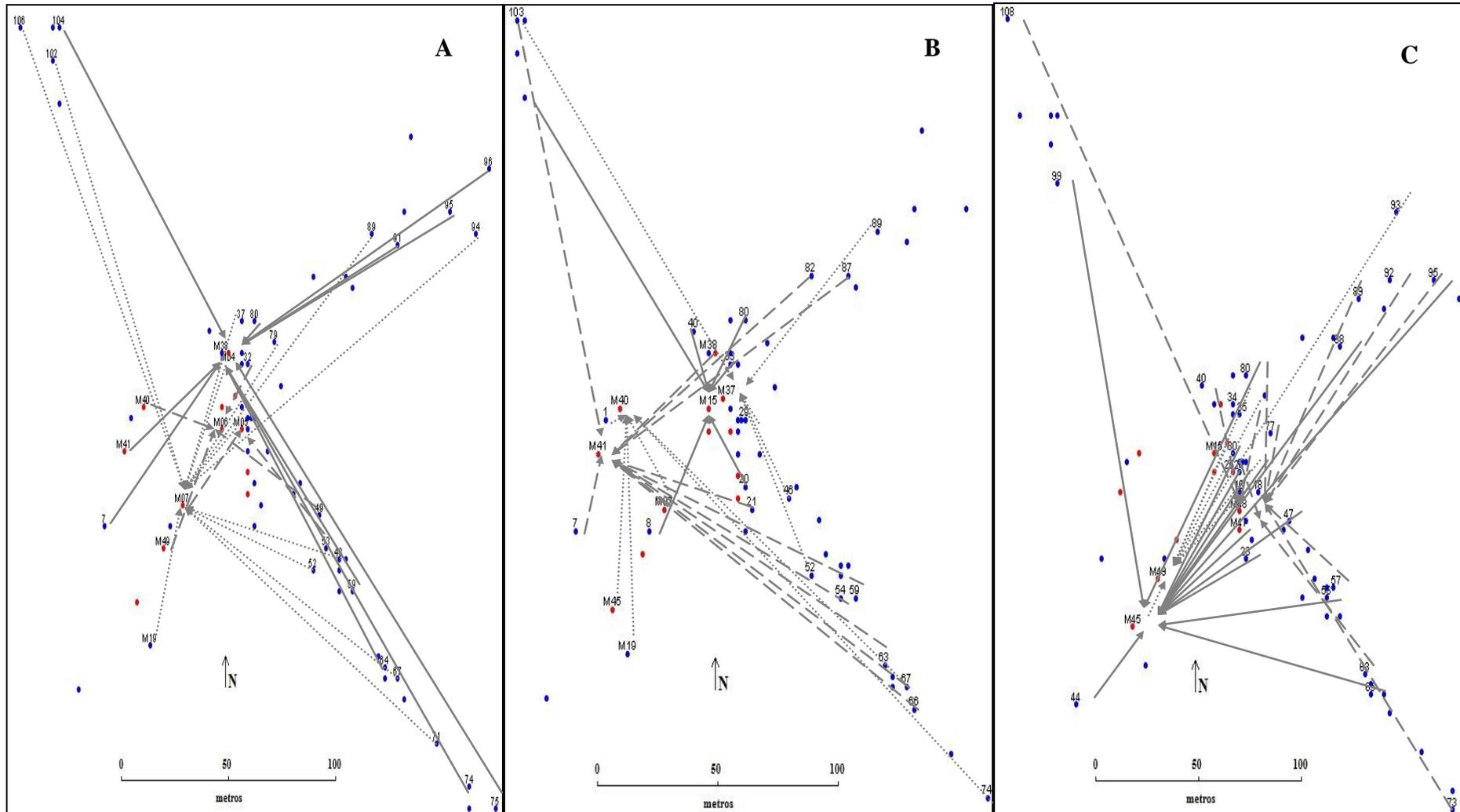


Figura 4.3 - Dispersão do pólen dos genitores identificados em cada uma das matrizes dentro de uma população de *Astrocaryum aculeatum* obtida por meio de análise de paternidade. As setas com tracejados (—), (--) e (··) indicam a dispersão do pólen. A) Genitores para as matrizes M04 (—), M05 (--) e M06 (··) e M07 (···). B) Genitores para as matrizes M15 (—), M37 (··), M40 (···) e M41 (---). C) Genitores para as matrizes M45 (—), M47 (---), M48 (---) e M49 (···). Mapa criado por S.L.F. Ramos, utilizando o programa DIVA-GIS v. 7.5 (DIVA-GIS, 2012)

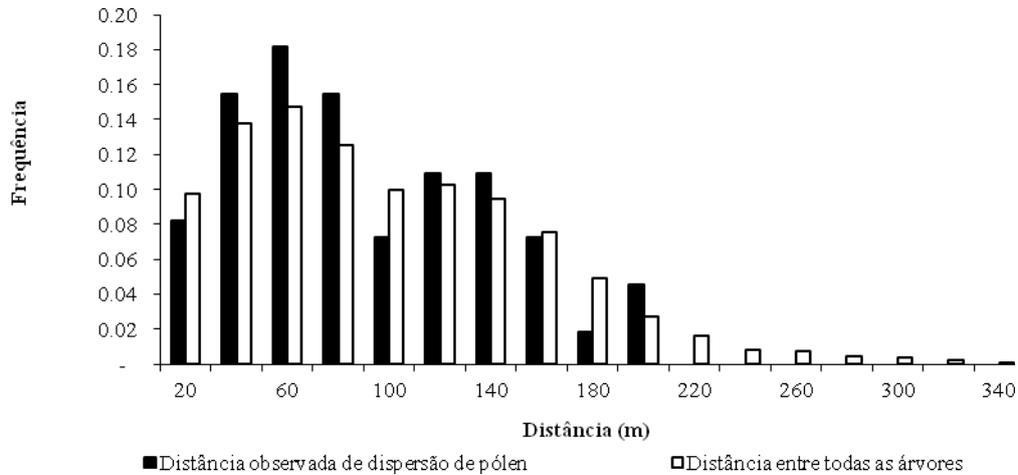


Figura 4.4 - Frequência efetiva da dispersão de pólen e a distância entre as árvores reprodutivas doadoras de pólen e as árvores mães das progênes em uma população de *Astrocaryum aculeatum*

Com relação à maioria de alelos exclusivos observados nos genitores e que não foram encontrados nas progênes, este dado sugere a ocorrência de deriva genética durante eventos reprodutivos uma vez que nem todos os alelos observados nos adultos foram passados para a prole (CARNEIRO et al., 2011), evento que pode estar relacionado a uma variação na fenologia floral levando à falta de sincronização em *A. aculeatum*. A antese desta espécie para as flores femininas é vespertina, as quais ficam viáveis por 24 horas, e as flores masculinas iniciam sua antese após o término das femininas ficando viáveis por apenas 6 horas (BACELAR-LIMA; MENDONÇA; BARBOSA, 2006). Deve-se levar em consideração que o *A. aculeatum* é uma planta monoica (dois sexos na mesma planta), com separação morfológica das flores masculinas e femininas nas inflorescências, contribuindo para evitar a autofecundação. Essa característica, aliada ao fato do tucumã apresentar protoginia, com sobreposição das fases sexuais (BACELAR-LIMA; MENDONÇA; BARBOSA, 2006), confirma a reprodução por cruzamentos da espécie (RAMOS et al., 2011b). Esta informação é confirmada ao observar que na análise de paternidade a taxa de autofecundação foi zero. Mas para ter melhor inferência sobre a os alelos exclusivos nos adultos seria necessário realizar coletas de sementes em mais de um evento reprodutivo.

A heterozigidade observada (H_O), embora superior à esperada (H_E) em ambas as gerações, não foram estatisticamente diferentes, indicando que ambas as gerações apresentam comportamentos similares e que a exploração extrativista não está afetando a diversidade genética na prole. Resultados similares foram observados em *Copaifera langsdorffii*

(SEBBENN et al., 2011) e *Hymenaea courbaril* (CARNEIRO et al., 2011). Consequentemente, não foi detectada endogamia em ambos adultos e progênes (Tabela 4,2). Resultados prévios sobre o sistema de reprodução indicam também que a reprodução ocorre somente por cruzamentos (RAMOS et al., 2011b), o que indicaria também, que possivelmente é uma estratégia do gênero, como observada em *A. mexicanum* (EGUIARTE; PEREZ-NASSER; PIÑERO, 1992). Resultados semelhantes foram ainda observados em outras espécies de palmeiras, como em *Geonoma schottiana* (SILVA; VIEIRA; CARVALHO, 2011), *Phoenix dactylifera* (ARABNEZHAD et al., 2012) e *Oenocarpus bataua* (OTTEWELL et al., 2012).

4.4.2 Estrutura genética espacial (EGE)

A EGE detectada entre os adultos da população sugere um padrão de dispersão de sementes de isolamento por distância. Logo plantas localizadas espacialmente próximas são em geral parentes (HARDY; VEKEMANS, 2002). A causa da EGE e a dispersão de pólen e sementes próximas a árvore matriz. *A. aculeatum* apresenta uma dispersão primária por chuva de sementes, geralmente concentrada no raio de projeção da copa de até 3,5 m (LOPES et al., 2012) e dispersão secundária que é feita por roedores cutias (*Dasyprocta* sp.) e cutiaras (*Myoprocta* sp.), os quais depositam sementes nas proximidades das plantas (JORGE; HOWE, 2009). Isso pode explicar a EGE observada.

Os resultados mostram também níveis relativamente baixos de coancestria (Figura 4.4) nas duas primeiras classes de distância (0-21 e 21-36 m), sendo estes valores próximos ao esperado entre primos de primeiro grau ($\theta_{xy}=0,0625$). Isso pode estar relacionado ao processo de formação e expansão das populações naturais de *A. aculeatum* o qual é relativamente reassente, já que estas teriam iniciado no ano de 1960, logo após o início do desmatamento da Amazônia (CAVIGLIA-HARRIS; SILLS, 2005) realizado pela prática do corte e queima (VIEIRA; SCARIOT, 2006). Assim, os pirênios (tegumento com amêndoa) de *A. aculeatum* que estavam presentes no banco de sementes das florestas clímax devido à dispersão primária e secundária (JORGE; HOWE, 2009; LOPES et al., 2012), iniciaram o processo de restauração destas áreas antropizadas (UHL, 1988). *A. aculeatum* é considerado uma espécie pioneira que consegue suportar mudanças bruscas de temperatura, como a causada por queimadas. As temperaturas elevadas provocam trincas e fissuras no tegumento do pirênio devido à rápida distensão (RAMOS et al, 2011a), o que permite a livre entrada de água e gases, e minimiza possíveis impedimentos físicos para o desenvolvimento do eixo embrionário (BRASIL, 2009). Este processo poderia ter levado à hiper-proliferação de

árvores de *A. aculeatum*, como é o caso das várias espécies de palmeiras que são denominadas de ocorrência secundária e invasivas na Amazônia, como *Astrocaryum acaule*, *Attalea humilis*, *Bactris maraja* e *Lepidocarium tenue*, que são conhecidas por aumentar suas densidades em habitats perturbados (SCARIOT, 1999). Assim, atualmente a dispersão desta espécie estaria relacionada já com o processo de estabelecimento da população, apresentando nesta área indivíduos com diferentes níveis de parentesco, com caracteres de história vital (CHV) e ação compensatória (*trade-off*) (FUTUYMA, 2005).

Quando medido o grau de EGE na primeira classe de distância (0 a 21 m), observou-se baixa intensidade da EGE ($S_p = 0,0139$). Estes resultados foram similares aos identificados nas populações com uma alta densidade de indivíduos por metro quadrado, para as espécies, *Dicorynia guianensis* ($S_p = 0,026$), *Vouacapoua americana* ($S_p = 0,012$) (HARDY et al., 2006), *Sanicula odorata* ($S_p = 0,0181$) e *Silene acaulis* ($S_p = 0,0144$) (VEKEMANS; HARDY, 2004), mostrando que a densidade é um dos principais determinantes da EGE. É esperado que a estatística S_p seja inversamente proporcional à densidade sob isolamento por distância, o que sugere que as distâncias de dispersão do pólen serão mais elevadas em baixa densidade populações (VEKEMANS; HARDY, 2004).

4.4.3 Coancestria e tamanho efetivo da população

O coeficiente de coancestria médio do grupo para os adultos ($\Theta = 0,023$) sugere que sob cruzamentos aleatórios, espera-se um nível baixo de endogamia (<1%) (SEBBENN et al., 2011). Entretanto, o tamanho efetivo da população (N_e) foi baixo e os 124 adultos representam apenas 22 indivíduos não parentes e não endogâmicos. Este baixo N_e reflete uma alta proporção de indivíduos relacionados e endogâmicos dentro da população. Esses dados confirmariam as hipóteses referentes à dispersão desta espécie e estaria relacionado com o processo de estabelecimento da população, apresentando nesta área indivíduos com diferentes níveis de parentesco, devido a história de vida da população EGE. Contudo, a taxa de migração de pólen (9,2%) pode no futuro aumentar a diversidade genética e este tamanho efetivo e contrapor os efeitos negativos da deriva genética.

4.4.4 Fluxo e padrões de dispersão do pólen

O fluxo de pólen de fora da população foi substancial (90,8%). Este fluxo gênico foi semelhante aos observados em outras espécies de árvores em populações naturais polinizadas pelo vento, que estão isoladas por mais de 1 km. Por exemplo, em *Araucaria angustifolia* com uma área de 5,4 ha e isolada por mais de 1,7 km, foi observada uma taxa de imigração de

pólen de 10% (BITTENCOURT; SEBBENN, 2007). Em uma área de 20 ha de *Pinus sylvestris*, isolado por mais de 5 km da população mais próxima, a imigração de pólen foi calculada em 4,3 % (ROBLEDO-ARNUNCIO; GIL, 2005), e com a mesma distância de isolamento, a espécie *Pinus flexilis*, em uma área de 15 ha, a imigração de pólen foi 6,5% (SCHUSTER; MITTON, 2000). Em outras pesquisas com populações não isoladas ou localizadas a distâncias inferiores a 1 km, as taxas de imigração são maiores. Como em uma população de *Quercus macrocarpa* em uma área de 5 ha isolada por mais de 200 m, que apresentou uma taxa de imigração de pólen de 57% (DOW; ASHLEY, 1998), assim como em uma área de 9,12 ha de *Pinus densiflora* isolada por mais de 100 m que apresentou uma imigração de 31% (LIAN; MIWA; HOGETSU, 2001). Assim, o resultado obtido em *A. aculeatum* sugere que a imigração de pólen contribui para a manutenção da diversidade genética (HOSHIKAWA; NAGAMITSU; TOMARU, 2012). Entretanto, quando observamos algum impacto antrópico na paisagem, que leva à fragmentação destas espécies, existe algum nível de impacto sobre a disponibilidade de pólen e seu movimento ao longo da paisagem, que pode levar em longo prazo a uma perda da diversidade genética e aumento de cruzamentos entre parentes (CARNEIRO et al., 2011), podendo assim, aumentar a proporção de cruzamentos correlacionados de 17,6% em *A. aculeatum* (RAMOS et al., 2011b) para valores superiores.

A dispersão de pólen atingiu longas distâncias dentro da população (194 m, entre a planta M48 e P108), visto que a maior distância entre duas plantas nesta população e de 211 m. Entretanto, o padrão de dispersão de pólen e de alta intencidade a curta distância dentro da população (Figura 4.4), visto pela alta correlação ($R^2=0,74$) detectada entre o número de sementes fertilizado por doadores de pólen localizados próximos as planta matrizes na população, o que foi confirmado com o teste de Kolmogorov-Smirnov, Figura 4.3. Os resultados indicam uma área efetiva de polinização com 63% dos doadores de pólen localizados dentro de uma área de 1,51 ha.

A média de dispersão de pólen foi superior, similar ou inferior quando comparado ao observado em outras espécies polinizadas pelo vento. A média detectada em *A. aculeatum* é superior à média detectada em árvores polinizadas pelo vento, como para *Pinus attenuata*, com 5,43 m (BURCZYK; ADAMS; SHIMIZU, 1996), entre 22,1-58,41 m em *Quercus robur* (STREIFF et al., 1999) e 18,41 a 64,56 m em *Quercus petraea* (STREIFF et al., 1999), semelhantes ao *Pinus densiflora*, com 68 m (LIAN; MIWA; HOGETSU, 2001) e em *Pinus sylvestris* com uma distância observada de 83 m (ROBLEDO-ARNUNCIO; GIL, 2005). Contudo foi inferior ao observado em *Fraxinus excelsior*, com 328 m (BACLES et al., 2005).

Assim, comparando a polinização pelo vento com estas outras espécies mencionadas. Entre os possíveis animais que podem polinizar ao tucumã-do-Amazonas pode-se mencionar os visitantes florais identificados na espécie *A. vulgare* (tucumã-do-Para), sendo estes da ordem Hymenoptera (abelhas das espécies *Trigona* sp. e *Apis mellifera*) e Coleoptera pertencentes às famílias Nitidulidae (espécie *Mystrops* sp.) e Curculionidae (*Terires minusculus*) (OLIVEIRA; COITURIER; BESERRA, 2003). No tucumã-do-Para, segundo estes autores as abelhas *Trigona* sp. e *Apis mellifera* foram observadas ainda na espata fechada (próxima da maturação), visitando botões florais em pré-antese e antese das flores masculinas (danificando estas partes florais na busca de pólen). As abelhas foram vistas nas inflorescências durante o dia, preferencialmente pela manhã e, devido ao seu comportamento de visita, estes autores acreditam que não devem exercer papel importante na polinização da palmeira tucumã. Entretanto, os insetos observados, tanto nas flores masculinas como nas femininas após sua exposição, foram os coleópteros (*Mystrops* sp. e *Terires minusculus*), provavelmente atraídos pelo odor. Estes pousaram nas ráquias e passearam pelas flores, tocando os estigmas. Os coleópteros visitaram as inflorescências durante o dia e a noite e foram vistos copulando (OLIVEIRA; COITURIER; BESERRA, 2003).

4.4.5 Implicações para a conservação, o cultivo de árvores e colheita de sementes

Os resultados deste estudo têm implicações importantes para estratégias de coleta de sementes para conservação *ex situ* de *A. aculeatum*, para o cultivo desta palmeira e para os reflorestamentos comerciais. A presença de estrutura genética espacial na população indica que sementes para conservação *ex situ* ou para instalação de áreas de produção devem ser colhidas de plantas matrizes localizadas a mais de 50 m de distância entre, para reduzir a probabilidade de ocorrer parentesco entre as sementes colhidas de diferentes matrizes. A inclusão de progenies aparentadas em bancos de germoplasma reduz o tamanho efetivo da população retida na amostra (BITTENCOURT; SEBBENN, 2007). No entanto, considerando o número finito de machos dentro da população, a presença de estrutura genética espacial e o fato de que 48% do pólen eficaz se origina de dentro de um raio de 69 m em torno da árvore matriz, pode-se esperar que as sementes serão compostas por uma mistura de meios-irmãos e irmãos completos, além de algum nível de endogamia por cruzamentos endogâmicos (BITTENCOURT; SEBBENN, 2007). Assim, as estimativas de parâmetros genéticos em testes de progênie que utilizam sementes de esta população precisam ser corrigidos para acomodar cruzamentos correlacionados e cruzamentos endogâmicos. Finalmente, a imigração

de pólen na população de outras populações é importante, porque pode aumentar a diversidade genética e tamanho efetivo da população.

4.5 Conclusões

Existe alta diversidade genética na população adulta, assim como nas progênes avaliadas, o que indicaria que a produção extrativista e comercialização de frutos não estaria levando à diminuição da diversidade genética nesta população.

A população estudada de *A. aculeatum* apresenta baixo tamanho efetivo devido à presença de estrutura genética espacial, causada pela dispersão de sementes a curtas distâncias, próxima das plantas matrizes, resultando em alta frequência de indivíduos parentes dentro da população.

O fluxo de pólen é substancial na população, mas sua dispersão segue um modelo de isolamento por distância e a maior parte dos cruzamentos ocorre entre plantas vizinhas.

É importante repetir este estudo em outras populações e/ou eventos reprodutivos para confirmar os resultados observados.

Referências

ADAMS, W.T. Gene dispersal within forest tree populations. **New Forests**, Dordrecht, v. 6, p. 217–240, Jan. 1992.

ARABNEZHAD, H.; BAHAR, M.; MOHAMMADI, H.R.; LATIFIAN, M. Development, characterization and use of microsatellite markers for germplasm analysis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 134, p. 150–156, Feb. 2012.

BACELAR-LIMA, C.G.; MENDONÇA, M.S.; BARBOSA, T.C.T.S. Morfologia floral de uma população de tucumã *Astrocaryum aculeatum* G. Mey (Arecaceae) na Amazônia central. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 36, p. 407–412, Dez. 2006.

BACLES, C.F.E.; BURCZYK, J.; LOWE, A.J.; ENNOS, R.A. Historical and contemporary mating patterns in remnant populations of the forest tree *Fraxinus excelsior* L. **Evolution**, Oxford, v. 59, p. 979–990, May. 2005.

BITTENCOURT, J.M.; SEBBENN, A.M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small fragmented population of a wind pollinated *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, London, v. 99, p. 580–591, Oct. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. 399p.

BURCZYK, J.; ADAMS, W.T.; SHIMIZU, J.Y. Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuata* Lemmon) stand. **Heredity**, London, v. 77, p. 251–260, Sep. 1996.

CARNEIRO, F.S.; LACERDA, A.E.B. ; LEMES, M.R.; GRIBEL, R.; KANASHIRO, M.; WADT, L.H.O.; SEBBENN, A.M. Effects of selective logging on the mating system and pollen dispersal of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) in the Eastern Brazilian Amazon as revealed by microsatellite analysis. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 262, p. 1758–1765, Nov. 2011.

CAVIGLIA-HARRIS, J.L.; SILLS, E.O. Land use and income diversification: comparing traditional and colonist populations in the Brazilian Amazon. **Agricultural Economics**, Malden, v. 32, p. 221–237, May 2005.

COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, Oxford, v. 23, p. 72–84, Mar. 1969.

DAVEY, J.W.; HOHENLOHE, P.A.; ETTER, P.D.; BOONE, J.Q.; CATCHEN, J.M.; BLAXTER, M.L. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. **Nature Reviews: Genetics**, London, v. 12, p. 499–510, July 2011.

DIVA-GIS. 2012. **User Manual, version 7.5** [en línea]. Disponível em: <http://www.diva-gis.org/docs/DIVA-GIS_manual_7.pdf>. Acesso em: 01 jun. 2013.

DOW, B.D.; ASHLEY, M.V. High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 89, p. 62–70, Jan. 1998.

DOW, B.D.; ASHLEY, M.V. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of sampling in bur oak, *Quercus macrocarpa*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 5, p. 615–627, Oct. 1996.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13–15, Jan. 1990.

EGUIARTE, L.E.; PEREZ-NASSER, N.; PIÑERO, D. Genetic - structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum Mexicanum* (Tropical Palm): Implications for evolution and conservation. **Heredity**, London, v. 69, p. 217–228, Mar. 1992.

FUTUYMA, D.J. **Evolution**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2005. 603p.

GODOY, J.A.; JORDANO, P. Seed dispersal by animal: exact identification of source trees with endocarp DNA microsatellites. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, p. 2275–2283, Sept 2001.

HAMRICK, J.L.; MURAWSKI, D.A.; NASON, J.D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. **Vegetatio**, Dordrecht, v. 107–108, p. 281–297, June 1993.

HARDY, O.J.; VEKEMANS, X. SPAGeDI: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, p. 618–620, Dec. 2002.

HARDY, O.J.; MAGGIA, L.; BANDO, E.; et al. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, p. 559–571, Feb. 2006.

HOSHIKAWA, T.; NAGAMITSU, T.; TOMARU, N. **Effects of pollen availability on pollen immigration and pollen donor diversity in riparian dioecious trees (*Salix arbutifolia*)**. *Botany*, Ottawa, v. 90, p. 481–489, June 2012.

JORGE, M.L.S.P.; HOWE, H.F. Can forest fragmentation disrupt a conditional mutualism? A case from central Amazon. **Oecologia**, Heidelberg, v. 161, p. 709–718, Oct. 2009.

JUMP, A.S.; PEÑUELAS, J. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 8096–8100, May 2006.

KAHN, F.; GRANVILLE, J.J. de. Palms and Forest Management in Amazonia. In: KAHN, F. (Ed). *Palms in Forest Ecosystems of Amazonia*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg/Ecological Studies v. 95, 1992.chap. 7, p. 155-167.

KALIA, R.K.; RAI, M.K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, Dordrecht, v.177, p.309–334, Feb. 2011.

KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, Oxford, v.16, p. 1099–1106, Mar. 2007.

KONAN, K.J.N.; KOFFI, KE.; KONAN, J.L.; LEBRUN, P.; DERY, S.K.; SANGARE, A. Microsatellite gene diversity in coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions resistant to lethal yellowing disease. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 6, p. 341-347, Feb. 2007.

KOTTEK, M., J. GRIESER, C. BECK, B. RUDOLF, AND F. RUBEL, 2006: World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. **Meteorologische Zeitschrift**, Stuttgart, v. 15, p. 259-263, June 2006.

LEVIN, D.A. The paternity pool plants. **The American Naturalist**, Chicago, v. 132, p. 309–317, Sep. 1988.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data (software) 2002. version 1.0. Disponível em: <<http://en.bio-soft.net/dna/gda.html>>. Acesso em: 20 jun.2010.

LIAN, C.; MIWA, M.; HOGETSU, T. Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. **Heredity**, London, v.87, p. 88–98, July 2001.

- LINDGREN, D.; MULLIN, T.J. Relatedness and status number in seed orchard crops. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 28, p. 276–283, Feb. 1998.
- LLERAS, E.; GIACOMETTI, D. C.; CORADIN, L. Áreas críticas de distribución de palmas en las Americas para colecta, evaluación y conservación. In: FAO. Informe de la reunión de consulta sobre palmeras poco utilizadas de América Tropical. Turrialba: FAO, 1983. p. 67-101.
- LOISELLE, B.A.; SORK, V.L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, St. Louis, v.82, p. 1420–1425, Nov. 1995.
- LOPES, M.T.G.; MACÊDO, J.L.V.D.; LOPES, R.; LEEUWEN, J.V.; RAMOS, S.L.F.; BERNARDES. Domestication and breeding of the Tucum Palm. In: BORÉM, A.; LOPES, M.T.G.; CLEMENT, C.R.; NODA, H. (Eds). **Domestication and breeding: Amazonian species**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2012 chap. 20, p. 421-436.
- MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUIK, L.E.B.; PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v.7, p. 639–655, May. 1998.
- MIRANDA, I.P.A.; RABELO, A.; BUENO, C.R.; BARBOSA, E.M.; RIBEIRO, M.N.S. Frutos de palmeiras da Amazônia. Manaus: Creative, 2001. 120p.
- OLIVEIRA, M.S.P.D.; SANTOS, J.B.D.; AMORIM, E.P.; FERREIRA, D.F. Variabilidade genética entre acessos de açaizeiro utilizando marcadores microssatélites. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, p. 1253-1260. Sep. 2010.
- OLIVEIRA, M.S.P.D.; COUTURIER, G.; BESERRA, P. Biologia da polinização da palmeira tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.) em Belém, Pará, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v.17, p. 343-353, July 2003.
- OTTEWELL, K.; GREY, E.; CASTILLO, F.; KARUBIAN, J. The pollen dispersal kernel and mating system of an insect-pollinated tropical palm, *Oenocarpus bataua*. **Heredity**, London, v. 109, p. 332–339, Dec. 2012.
- OUBORG, N.J.; PERTOLDI, C.; LOESCHCKE, V.; BIJLSMA, R.; HEDRICK, P.W. Conservation genetics in transition to conservation genomics. **Trends in Genetics**, Oxford, v. 26, p. 177–187, Apr. 2010.
- RAMOS, S.L.F.; LOPES, M.T.G.; LOPES, R.; CUNHA, R.N.V. da; MACÊDO, J.L.V. de; CONTIM, L.A.S.; CLEMENT, C.R.; RODRIGUES, D.P.; BERNARDES, L.G. Determination of the mating system of Tucumã palm using microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 11, p. 181–185, June 2011b.
- RAMOS, S.L.F.; MACÊDO, J.L.V. de; MARTINS, C.C.; LOPES, R.; LOPES, M.T.G. Tratamentos pré-germinativos e procedência de sementes do tucumã-do-Amazonas para a produção de mudas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, p. 962-969, Sept. 2011a.

- RAMOS, S.L.F.; MACEDO, J.L.V.; LOPES, M.T.G.; BATISTA, J.S.; FORMIGA, K.M.; DA SILVA, P.P.; SAULO-MACHADO, A.C.; VEASEY, E.A. Microsatellite loci for tucumã of Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) and amplification in other Arecaceae. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 99, p. e508–e510, Dec. 2012.
- RAMOS, S.L.F.; MACÊDO, J.L.V.; LOPES, S.S.; RAMOS, L.F.F. **Técnicas para facilitar a germinação das sementes de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer)**. Manaus: Embrapa, AM – Brasil. Dezembro, 2009. 6p. (Embrapa Amazônia Ocidental, Comunicado Técnico, 77)
- RIBEIRO, F.E.; BAUDOUIN, L.; LEBRUN, P.; CHAVES, L.J.; BRONDAN, C.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R. Population structures of Brazilian tall coconut (*Cocos nucifera* L.) by microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, p. 696–702. Sept. 2010.
- ROBLEDO-ARNUNCIO, J.J.; GIL, L. Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. **Heredity**, London, v. 94, p. 13–22, Aug. 2005.
- ROSAS, F.; QUESADA, M.; LOBO, J.A.; SORK, V.L. Effects of habitat fragmentation on pollen flow and genetic diversity of the endangered tropical tree *Swietenia humilis*(Meliaceae). **Biological Conservation**, Amsterdam, v. 144, p. 3082–3088, Dec. 2011.
- SCARIOT, A. Forest fragmentation effects on palm diversity in Central Amazonia. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 87, p. 66–76, Feb. 1999.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, New York, v.18, p. 233–234, Feb. 2000.
- SCHUSTER, W.S.F.; MITTON, J.B. Paternity and gene dispersal in limber pine (*Pinus flexilis*James). **Heredity**, London, v.84, p. 348–361, Mar. 2000.
- SEBBENN, A.M.; CARVALHO, A.C.M.; FREITAS, M.L.M.; MORAES, S.M.B.; GAINO, A.P.S.C.; DA SILVA, J.M.; JOLIVET, C.; MORAES, M.L.T. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, London, v.106, p. 134–145, Apr. 2011.
- SILVA, M.S.; VIEIRA, F.A.; CARVALHO, D. Diversity and genetic structure in natural population of *Geonoma schottian* Mart (ARECACEAE): implications for conservation. **Cerne**, Lavras, v. 17, p. 195–201, June 2011.
- SMOUSE, P.E.; SORK, V.L. Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 197, p. 21–38, Aug. 2004.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry: Principles and Practices of Statistics in Biological Research**. 3rd ed. New York: W.H. Freeman, 1995. 880p.
- SOSNOWSKA, J.; BALSLEV, H. American palm ethnomedicine: A meta-analysis. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, London, v. 5, p. 43–53, Dec. 2009.

SOUSA, V.A.; HATTEMER, H.H. Pollen dispersal and gene flow by pollen in *Araucaria angustifolia*. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 51, p. 309–317, June 2003.

STREIFF, R.; DUCOUSSO, A.; LEXER, C.; STEINKELLNER, H.; GLOESSL, J.; KREMER, A. Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea*(Matt.) Liebl. **Molecular Ecology**, Oxford, v.8, p. 831–841, May. 1999.

UHL, C. Restoration of degraded lands in the Amazon Basin. In: WILSON, E.O; PETER, F.M. (eds.) **Biodiversity**. Washington, DC: National Academy Press, 1988. p. 326-332.

VEKEMANS, X.; HARDY, O.J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analysis in plant populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 921–935, Apr. 2004.

VIEIRA, D.L.M.; SCARIOT, A. Principles of natural regeneration of tropical dry forests for restoration. **Restoration Ecology**, Hoboken, v. 14, p. 11–20, Mar. 2006.