Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
Centro de Energia Nuclear na Agricultura

Estudos genéticos em populações naturais de Macaúba em Reservas Legais de
assentamentos rurais no Pontal do Paranapanema

Natália Helena Pessa Coelho

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ecologia
Aplicada

Piracicaba
2017

Natália Helena Pesso Coelho
Bacharel em Ciências Biológicas

Estudos genéticos em populações naturais de Macaúba em Reservas Legais de assentamentos
rurais no Pontal do Paranapanema

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

Prof. Dr. **FLÁVIO BERTIN GANDARA MENDES**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ecologia
Aplicada

Piracicaba
2017

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

Coelho, Natália Helena Pessô

Estudos genéticos em populações naturais de Macaúba em Reservas Legais de assentamentos rurais no Pontal do Paranapanema / Natália Helena Pessô Coelho. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

69 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Centro de Energia Nuclear na Agricultura.

1. *Acrocomia aculeata* 2. Diversidade genética 3. Estrutura genética espacial . . I. Estudos genéticos em populações naturais de Macaúba em Reservas Legais de assentamentos rurais no Pontal do Paranapanema

DEDICATÓRIA

Para uma pessoa de grandes ideais, sempre na luta a favor das causas sócio-ambientais. Defensor da justiça social, da conservação biológica, da biodiversidade e da agroecologia. Importante pesquisador na conservação e recuperação dos recursos naturais.

Apoiou e incentivou estudos com a palmeira macaúba, orientando o presente estudo. Inspirou pessoas, inclusive esta que escreve.

Faleceu deixando um grande legado, vários exemplos a serem seguidos e muita saudade.

Ao professor Dr. Paulo Yoshio Kageyama, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por ser o exemplo que quero sempre seguir.

Aos meus pais Antônio Augusto, Sônia e à minha irmã Tatiana, porque sempre acreditaram no meu potencial e me incentivaram e me apoiaram a todo instante, sempre dando suporte para eu conseguir enfrentar as adversidades.

A todos da minha família: os meus avôs, minhas tias e tios e aos meus primos.

À Déia, um anjo que encontrei na ESALQ, pela alegria contagiante, ajuda nos momentos de crise e suporte em todos os assuntos.

Aos meus queridos amigos, que minha passagem por Piracicaba me rendeu e que levarei para vida toda Josi, Ricardo, Carol, Maysa e Luciana.

Ao professor Paulo Yoshio Kageyama *in memoriam*, pela orientação, pelo conhecimento transmitido, pela sua atenção constante, incentivo e pelo apoio incondicional nos momentos difíceis. Um exemplo como pessoa e como cientista.

Ao meu orientador Prof. Dr. Flávio Bertin Gandara, por ter aceitado me orientar após a passagem do prof. Paulo, por ter me apoiado e ajudado em tudo que pôde. Com muita paciência e dedicação. Muito obrigada!

Aos amigos do LARGEA, Déia, Elza, Bruninha, Evandro, Marcelo e Lya pelos momentos agradáveis que passamos juntos e por toda a ajuda que sempre foi dada.

Agradeço à Bruninha, à Lya e ao Marcelo pela continuidade das extrações de DNA na minha ausência.

Ao Prof Dr. Evandro Vagner Tambarussi pela atenção, pela (muita) paciência e pela colaboração na parte estatística.

Aos membros da banca de qualificação, Dr. João Dagoberto e Prof. Dr. Evandro Tambarussi, pelas preciosas sugestões.

Às técnicas do laboratório LARGEA pela ajuda em todas as etapas do trabalho, Elza Ferraz e Andréia Moreno.

Ao técnico Jefferson Polizel e ao Ricardo, pela elaboração dos mapas usados na dissertação.

Ao técnico Beto, e ao prof. Antônio Natal, pela ajuda na germinação dos embriões *in vitro*.

Aos participantes do projeto “Bioenergia com Biodiversidade e Segurança Alimentar, no Pontal do Paranapanema, utilizando Sistemas Agroflorestais”, que me ajudaram e tornaram meus momentos no Pontal do Paranapanema muito divertidos e agradáveis, apesar de algumas adversidades em campo.

A todos que me ajudaram nas coletas de campo: Germano, Fred, Andréia, Otávio, Maira, inclusive minha mãe, Sônia.

Ao pessoal do IAC pela ajuda na escolha do local em Amparo e na coleta Carlos Colombo, Joaquim, Brenda e Bárbara. E à Stella Nucci pela acessibilidade e gentileza quando entrei em contato.

Ao Luiz Bertin, pelo auxílio na aplicação do protocolo de germinação nos frutos de macaúba, troca de informações e empréstimo de figuras.

À Mara Casin, secretária do PPGI-EA, por sempre estar disponível, ser gentil, pelas palavras de conforto e por toda a ajuda durante todo o processo.

À FAPESP pelo projeto auxiliar que possibilitou a execução do trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

Aos meus pais por me manterem em Piracicaba após o término da bolsa.

Enfim, a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, colaboraram para que esse trabalho fosse concretizado.

EPÍGRAFE

"A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo"

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. OBJETIVOS	12
1.2. HIPÓTESES	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. MATA ATLÂNTICA	13
2.2. RESERVAS LEGAIS E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE	14
2.3. O PONTAL DO PARANAPANEMA	15
2.4. FAMÍLIA ARECACEAE - <i>ACROCOMIA ACULEATA</i> (JACQ.) LODD. EX MART.	18
2.5. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	22
2.6. DIVERSIDADE GENÉTICA	24
2.7. MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES	25
2.8. ESTRUTURA GENÉTICA.....	26
2.9. SISTEMA DE REPRODUÇÃO	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. ÁREAS DE ESTUDO	29
3.2. COLETA DE MATERIAL PARA ESTUDO.....	30
3.3. GERMINAÇÃO DOS EMBRIÕES	32
3.4. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA.....	33
3.5. GENOTIPAGEM	34
3.6. ANÁLISE DE DADOS.....	35
3.6.1. <i>Análise de desequilíbrio de ligação</i>	35
3.6.2. <i>Análise da diversidade genética, endogamia e diferenciação genética entre e dentro de populações</i>	35
3.6.3. <i>Estrutura genética espacial</i>	36
3.6.4. <i>Sistema de reprodução</i>	37
4. RESULTADOS	39
4.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA.....	39
4.2. DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....	40
4.3. ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA, ÍNDICE DE FIXAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE POPULAÇÕES.....	41
4.4. ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL.....	433
4.5. SISTEMA REPRODUTIVO	44
5. DISCUSSÃO	47
5.1. DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....	47
5.2. DIVERSIDADE GENÉTICA, ÍNDICE DE FIXAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE POPULAÇÕES	47
5.3. ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL.....	50
5.4. SISTEMA DE REPRODUÇÃO.....	51
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS	55
ANEXO.....	55

RESUMO

Estudos genéticos em populações naturais de macaúba em Reservas Legais de assentamentos rurais no Pontal do Paranapanema

A espécie *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. é uma palmeira nativa, popularmente conhecida como macaúba, que possui ampla utilização desde a indústria alimentícia até na produção de biodiesel. Para estudos genéticos, foram coletados e extraído DNA de 50 indivíduos da espécie em três assentamentos no Pontal do Paranapanema-SP (FU, PJ e GB) e em Amparo-SP (AM) totalizando 200 amostras. Os objetivos do trabalho foram caracterizar a diversidade genética, a estrutura genética espacial (EGE) e o sistema reprodutivo da espécie no Pontal do Paranapanema. A diversidade genética foi caracterizada pelos parâmetros: número de alelos por loco ($\hat{A}$), heterozigosidades observada ($\hat{H}_o$) e esperada ($\hat{H}_e$) e índice de fixação ($\hat{F}$). As estatísticas F foram utilizadas como parâmetro de diferenciação genética entre ($\hat{F}_{ST}$) e dentro das subpopulações ($\hat{F}_{IS}$). A EGE foi realizada pela estimativa do coeficiente de coancestria ($\hat{\theta}_{xy}$) entre pares de árvores em relação a posição espacial destas. As populações de macaúba estudadas apresentaram níveis relativamente altos de polimorfismo, pois dos nove locos utilizados obteve-se um total de 103 alelos, sendo que 34 alelos são privados. O $\hat{H}_o$ médio variou de 0,410 a 0,531; O $\hat{H}_e$ médio variou de 0,547 a 0,615. O F apresentou valores positivos e significativos (0,119, 0,173 e 0,276) nas médias de PJ, GB e AM, respectivamente. As estatísticas F mostraram 16,8% de diferenciação entre as populações, ou seja, a maior parte da diversidade genética se encontra dentro das populações. Apenas para a população FU a EGE não foi significativa, na população PJ foi significativa na distância de 810 m ($\hat{\theta}_{xy}=0,0211$), porém foi considerado sem significado biológico. Nas outras o $\hat{\theta}_{xy}$ foi significativo nas distâncias de 38 m ($\hat{\theta}_{xy}=0,0182$ a $\hat{\theta}_{xy}=0,0418$) e 71 ($\hat{\theta}_{xy}=0,0213$ a $\hat{\theta}_{xy}=0,0934$) para GB e AM, respectivamente, indicando que indivíduos dentro destas distâncias possuem algum grau de parentesco. Os parâmetros para estudar o sistema de reprodução foram calculados pelo MLTR e foram utilizadas 246 progênies (20 mães) da população FU, obtendo os parâmetros $\hat{t}_m=0,97$, $\hat{t}_s=0,928$, $\hat{t}_m - \hat{t}_s=0,042$, $\hat{r}_s=0,1$ e $\hat{r}_{p(m)}=0,015$. O número efetivo de doadores de pólen foi 66,66, a porcentagem de meio-irmãos, irmãos de autofecundação e cruzamento, irmãos completos e irmãos de autofecundação foram 92,7%, 5,8%, 1,4% e 0,09%, respectivamente. O tamanho efetivo foi 3,10, a coancestria foi $\hat{\Theta}=0,134$ e o número de matrizes foi $\hat{m}=48,29$. A macaúba é uma palmeira alógama, não houve correlação significativa de paternidade e o número de matrizes para coleta de sementes deve ser pelo menos 15 sementes de 49 árvores.

Palavras-chave: *Acrocomia aculeata*; Diversidade genética; Estrutura genética Espacial; Sistema de reprodução

ABSTRACT

Genetic studies in natural populations of macaw palm in Legal Reserves of rural settlements at Pontal do Paranapanema

Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart. is a native palm, also known as Macaw, which has widespread utilization in the food industry as well as for biodiesel oil production. Samples were collected and DNA was extracted from 50 adult individuals in each of the three rural settlements at Pontal do Paranapanema (FU, PJ and GB) and at Amparo-SP (AM), totaling 200 samples. The study aimed to characterize the genetic diversity, spatial genetic structure (SGS) and the mating system in the Pontal do Paranapanema. Genetic diversity was estimated by number of alleles per locus ($\hat{A}$), observed ($\hat{H}_o$) and expected heterozygosity ($\hat{H}_e$), fixation index ($\hat{F}$). The $\hat{F}$ statistics were used as genetic differentiation parameter among and within subpopulations. The SGS was studied by coancestry coefficient ($\hat{\theta}_{xy}$) between pair of trees. The studied populations showed relatively high levels of polymorphism using nine microsatellites loci with a total of 103 alleles, where 34 of these are private. The average of $\hat{H}_o$ and $\hat{H}_e$ ranged from 0.410 to 0.531 and 0.547 to 0.615, respectively. The fixation index ($\hat{F}$) presented positive and significant values in average for PJ (0.119), GB (0.173) and AM (0.276), respectively. The genetic differentiation ($\hat{F}_{ST}$) was 16,8%, so most of the diversity is within populations. Only in the FU population the SGS was not significant, was significant up to 810 m ($\hat{\theta}_{xy} = 0.0211$) for PJ with no ecological meaning. This parameter ($\hat{\theta}_{xy}$) was significant at up to 38 m ($\hat{\theta}_{xy} = 0.0182$ a $\hat{\theta}_{xy} = 0.0418$) and 71 m ($\hat{\theta}_{xy} = 0.0213$ a $\hat{\theta}_{xy} = 0.0934$) for GB and AM, respectively, indicating that individuals within these distances are related. The parameters to study the mating system were calculated using MLTR with 246 siblings of open pollination of 20 maternal families trees of the FU population, showing values of $\hat{t}_m = 0,97$, $\hat{t}_s = 0,928$, $\hat{t}_m - \hat{t}_s = 0,042$, $\hat{r}_s = 0,1$ e $\hat{r}_{p(m)} = 0,015$. The number of effective pollen donors was 66,66, the percentage of the pairwise half sibs self-half-sibs, full sibs and self sibs were 92,7%, 5,8%, 1,4% and 0,09%, respectively. The effective size was 3,10, the coancestry was $\hat{\Theta} = 0,134$ and the number of matrices $\hat{m} = 48,29$. The macaw palm is an outcrossing palm, there was no significant correlation of paternity and the collection of seeds should be in at least 15 seeds from more than 49 trees to keep a high genetic diversity.

Keywords: *Acrocomia aculeata*; Genetic diversity; Spatial genetic structure; Mating system

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ÁREA TOTAL DA MATA ATLÂNTICA EM AMARELO CLARO, OS FRAGMENTOS RESTANTES EM VERDE E OS DESMATAMENTOS ENTRE 2013-2014. RETIRADA DO ATLAS DA SOS MATA ATLÂNTICA E INPE (2015).....	13
FIGURA 2. LOCALIZAÇÃO DA SUB-REGIÃO DO PONTAL DO PARANAPANEMA NO ESTADO DE SÃO PAULO. FONTE: ELABORADO E RETIRADO DE FIRETTI ET AL. (2010).	15
FIGURA 3. COBERTURA FLORESTAL DA REGIÃO DO PONTAL DO PARAPANEMA DE 1953 A 2003. OS RIOS ESTÃO EM CINZA ESCURO E A VEGETAÇÃO EM CINZA CLARO. FONTE: RETIRADO DE UEZU (2006). ESCALA 1:1.000.000.....	16
FIGURA 4. FRAGMENTOS NA REGIÃO DO PONTAL DO PARANAPANEMA, SENDO O MAIOR DELES O PARQUE ESTADUAL MORRO DO DIABO E OS QUATRO FRAGMENTOS DESTACADOS ESTAÇÃO ECOLÓGICA MICO-PRETO. FONTE: SITE IPE.....	17
FIGURA 5. INDIVÍDUO DE MACAÚBA ENCONTRADO NO PONTAL DO PARANAPANEMA. ACERVO PESSOAL, POPULAÇÃO FUSQUINHA.....	19
FIGURA 6. MAPA DA DISTRIBUIÇÃO DA MACAÚBA NO CONTINENTE AMERICANO E NO BRASIL. FONTE: BERTON, 2013.	20
FIGURA 7. VISÃO GERAL DA PALMEIRA, SEU ESTIPE E FOLHAS (A), A ESPATA E A INFLORESCÊNCIA (B) E OS CACHOS DE FRUTOS (C). ACERVO PESSOAL.	22
FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO DA QUANTIDADE (KG) DE ÓLEO POR HECTARE POR ANO, DE DIVERSAS CULTURAS OLEAGINOSAS. FIGURA DE BERTON, 2015.....	23
FIGURA 9. MAPA COM OS QUATRO PONTOS DE COLETAS, TRÊS DELES NO PONTAL DO PARANAPANEMA (FU, PJ E GB), EXTREMO OESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO E UM EM AMPARO (AM). ACERVO PESSOAL, MAPA FEITO POR JEFFERSON L. POLIZEL (2015).....	29
FIGURA 10. AS ÁREAS DE ESTUDO APRESENTAM MACAÚBA COM OCORRÊNCIA ESPONTÂNEA, FORMANDO MACIÇOS PRATICAMENTE HOMOGÊNEOS DA ESPÉCIE. (ACERVO PESSOAL, ÁREA NA GLEBA XV DE NOVEMBRO).	30
FIGURA 11. AS FOLHAS FORAM COLETADAS COM O AUXÍLIO DE UM PODÃO (A), ACONDICIONADAS EM SACOS DE PAPEL E IDENTIFICADAS COM O NOME DO LOCAL E NO NÚMERO DA MATRIZ (B) E ARMAZENADAS EM CAIXAS DE PLÁSTICO COM SÍLICA, PARA SEREM LEVADAS AO LABORATÓRIO. AS MATRIZES FORAM MARCADAS COM PLAQUINHA E GEOREFERENCIADAS. ACERVO PESSOAL.....	31
FIGURA 12. DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DOS GENÓTIPOS COLETADOS NOS ASSENTAMENTOS GLEBA XV DE NOVEMBRO (MUNICÍPIO DE ROSANA), PADRE JOSIMO E FUSQUINHA (MUNICÍPIO DE TEODORO SAMPAIO) E UMA PROPRIEDADE PARTICULAR NA CIDADE DE AMPARO. OS INDIVÍDUOS ESTÃO REPRESENTADOS POR PONTOS AMARELOS EM CADA ÁREA DE COLETA. FONTE: ACERVO PESSOAL, MAPA FEITO POR JEFFERSON L. POLIZEL.	32
FIGURA 13. EXEMPLO DE GÉIS DE AGAROSE DE QUANTIFICAÇÃO DE DNA FOLIAR DOS INDIVÍDUOS DE <i>ACROCOMIA ACULEATA</i>. (A). E DE DNA DOS EMBRIÕES GERMINADOS <i>IN VITRO</i> (B). AS TRÊS PRIMEIRAS COLUNAS APRESENTAM CONCENTRAÇÕES ASCENDENTES DE A DNA: 20, 100, E 300 NG/ML RESPECTIVAMENTE, EM AMBOS. FONTE: ACERVO PESSOAL.	39
FIGURA 14. ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL NAS POPULAÇÕES FU (A), GB (B), PJ (C) E AM (D) DE <i>ACROCOMIA ACULEATA</i>. A LINHA CONTÍNUA SE REFEREM A ESTIMATIVA DO COEFICIENTE DE COANCESTRIA MÉDIO E AS LINHAS PONTILHADAS SE REFEREM À ESTIMATIVA DO INTERVALO DE CONFIANÇA DO ERRO DE 95%. FONTE: ACERVO PESSOAL.	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. SEQUÊNCIAS DOS NOVE LOCOS DE MICROSSATÉLITES UTILIZADOS PARA A GENOTIPAGEM DOS INDIVÍDUOS DE <i>ACROCOMIA ACULEATA</i> NAS POPULAÇÕES FUSQUINHA, PADRE JOSIMO, GLEBA XV DE NOVEMBRO E AMPARO.....	35
TABELA 2. DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS QUATRO LOCOS PARA AS QUATRO POPULAÇÕES DE <i>ACROCOMIA ACULEATA</i>. O VALOR LIMITE DE SIGNIFICÂNCIA APÓS A CORREÇÃO DE BONFERRONI É 0,00035.....	40
TABELA 3. PARÂMETROS GENÉTICOS CALCULADOS PARA NOVE LOCOS MICROSSATÉLITES DESENVOLVIDOS PARA A. <i>ACULEATA</i>: ALELOS TOTAIS ($\hat{A}_T$), TAMANHO DA AMOSTRA PARA CADA POPULAÇÃO (n), NÚMERO DE ALELOS ($\hat{A}$), HETEROZIGOSIDADE ESPERADA ($\hat{H}_e$), HETEROZIGOSIDADE OBSERVADA ($\hat{H}_o$) E ÍNDICE DE FIXAÇÃO ($\hat{F}$).	43
TABELA 4. LOCOS MICROSSATÉLITES ANALISADOS PARA <i>ACROCOMIA ACULEATA</i> NAS POPULAÇÕES FUSQUINHA (FU), PADRE JOSIMO (PJ), GLEBA XV (GB) E AMPARO (AM)., ALELOS TOTAIS POR LOCO ($\hat{A}_T$), ALELO POR LOCO ($\hat{A}$), ALELO RARO ($\hat{A}_r$), ALELO RARO E PRIVADOS ($\hat{A}_{rp}$) E ALELO PRIVADO ($\hat{A}_p$).....	43
TABELA 5. PARÂMETROS DO SISTEMA REPRODUTIVO DE <i>ACROCOMIA ACULEATA</i> PARA A A POPULAÇÃO FUSQUINHA, PONTAL DO PARANAPANEMA, SP (IC É O INTERVALO DE CONFIANÇA CALCULADO POR 1000 BOOTSTRAPS).....	43

1. INTRODUÇÃO

No Brasil há seis biomas: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa (IBGE, 2004). O primeiro bioma a ser afetado pelo desmatamento advindo da colonização e exploração do pau-brasil no país foi a Mata Atlântica, que originalmente ocupava 15% da área do país (SOS MATA ATLÂNTICA, 2015). Dados obtidos pela Fundação SOS Mata Atlântica e o INPE, entre 2013 e 2015, apontam que, apesar das taxas de desmatamento terem reduzido, este bioma ainda está sendo devastado, sendo que a área original está reduzida a 12,5% (SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2015).

O Estado de São Paulo possui, atualmente, 13,9 % de seu território ocupado por campos e florestas em diferentes estágios de conservação, em grande parte pela formação chamada de Mata Atlântica (SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2015).

Este desmatamento provoca a fragmentação do habitat, que provoca principalmente a alteração da composição florestal do ambiente, com extinção de espécies peculiares de áreas fechadas e estabelecimento de outras, típicas de áreas abertas. Este fato ocorre porque a fragmentação reduz a área total florestada e expõe suas áreas internas, o que pode acarretar a perda de espécies. Além disso, a fragmentação causa efeitos de bordas nos fragmentos restantes expondo os organismos remanescentes a condições diferentes da anterior (MURCIA, 1995).

Sabe-se que a intervenção humana tem efeito desestabilizador sobre os ecossistemas naturais, perturbando seu equilíbrio dinâmico (KAGEYAMA et al., 2003). Consequentemente, há um aumento no total de áreas degradadas e fragmentadas com baixa conectividade entre remanescentes florestais, biodiversidade reduzida e risco de extinção local de espécies (KAGEYAMA et al., 2003). Parte dos efeitos da devastação e consequente fragmentação podem ser estudados e verificados pelas ferramentas genéticas com o uso de marcadores moleculares, além de seu uso para a conservação das espécies (KAGEYAMA et al., 1998).

A região do estudo fica no chamado Pontal do Paranapanema, considerada uma das regiões mais devastadas do Estado pelo uso e ocupação do solo (LEITE, 1999; DITT, 2002). Restam hoje na região apenas 8,5% de vegetação nativa, segundo dados do Instituto Florestal (SIFESP, 2009); apesar deste fato, encontra-se na região o maior remanescente de Floresta Estacional Semidecidual do Estado de São Paulo, o Parque Estadual do Morro do Diabo.

A região possui o segundo pior Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do Estado, e é marcada por conflitos sociais pela posse da terra e ocupações ocorridas nos anos 80, com aproximadamente 6.000 famílias assentadas (LEITE, 1999; TERRITÓRIO DA CIDADANIA, 2013).

Visando aumentar a renda e melhorar a qualidade de vida destas famílias, por meio da utilização da riqueza de espécies nativas da região, o Grupo de Pesquisa em Desenvolvimento de Assentamentos Rurais e Agricultura Familiar da ESALQ/USP e financiado pelo MDA (Governo Federal) estão desenvolvendo o Projeto de Pesquisa intitulado “Bioenergia com Biodiversidade e Segurança Alimentar, no Pontal do Paranapanema, utilizando Sistemas Agroflorestais”. Esse estudo visa estudar o potencial econômico da macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) como espécie produtora de óleo para biodiesel e utilizá-la em sistemas agroflorestais, associada a espécies frutíferas tropicais aptas para a região, assim como árvores nativas com potencial de serviços ecossistêmicos, nos assentamentos rurais da região, de maneira sustentável. Para que isso se concretize, há a necessidade de se conhecer e obter informações sobre o sistema de reprodução, a diversidade e estrutura genética da região.

A macaúba ocorre em ampla distribuição geográfica pelo Brasil e forma grandes maciços nos assentamentos rurais do Pontal do Paranapanema. Com o seu crescente potencial de utilização econômica, especialmente para o biodiesel, alguns estudos são necessários para melhor conhecimento sobre a espécie e serem utilizados para beneficiar as populações rurais e estimular o desenvolvimento sócioeconômico da região, especialmente os agricultores familiares, melhorando o manejo das populações naturais e viabilizando implantação em sistemas agroflorestais. Isto porque, os sistemas agroflorestais são uma alternativa de estímulo econômico à recuperação e mesmo à conservação da diversidade biológica (RODRIGUES et al., 2007). O Pontal do Paranapanema, por possuir alguns milhares de hectares com populações naturais dessa espécie, entremeadas nos milhares de lotes dos assentamentos rurais, é uma região de prioridade para tais estudos genéticos e agronômicos.

Neste contexto, surge a importância dos estudos na caracterização e avaliação da variação genética entre e dentro destas populações naturais, assim como o estudo da sua taxa de cruzamento, visando utilizá-los posteriormente para estabelecer estratégias de manejo, em projetos de conservação e melhoramento genético na região do Pontal do Paranapanema, sem que elas percam sua diversidade genética.

1.1. Objetivos

O estudo teve por objetivos avaliar a diversidade genética de populações de *Acrocomia aculeata* em Reservas Legais de assentamentos rurais na região do Pontal do Paranapanema e contribuir para o aprimoramento do manejo da espécie e sua conservação genética na região.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Caracterizar a diversidade genética inter e intrapopulacional, utilizando marcadores moleculares microssatélites;
- Estimar a estrutura genética espacial da espécie;
- Estimar a taxa de cruzamento e o parentesco médio entre indivíduos.

1.2. Hipóteses

Foram consideradas as hipóteses:

- A espécie apresenta elevada diversidade genética, entre e dentro de populações;
- Há estrutura genética intrapopulacional devido à síndrome de polinização a curta distância;
- A espécie apresenta sistema reprodutivo preferencialmente por alogamia, como a maioria das espécies de palmeiras.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Mata Atlântica

A Mata Atlântica é considerada pelo IBGE como um dos seis biomas brasileiros, juntamente com Amazônia, Caatinga, Cerrado, Pantanal e Pampa. Nela pode-se encontrar as formações vegetais chamadas de Florestas estacionais semidecíduais, florestas ombrófilas densas e mistas e florestas decíduas (IBGE, 2004).

Devido à colonização europeia e a subsequente exploração do pau-brasil, a Mata Atlântica foi o primeiro bioma a ser afetado pelo desmatamento no Brasil e, desde então, tem sido devastada, principalmente, pela exploração da madeira, carvão, mineração, agricultura e pecuária (YOUNG, 2005). Originalmente, as formações vegetais desse bioma ocupavam 15% da área do país, hoje sua área original está reduzida a apenas 12,5% do seu tamanho original (SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2015). Este desmatamento pode ser visualizado na Figura 1. As formações florestais deste bioma incluem a Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista e Floresta Estacional Semidecidual, em estágios primário, secundário e avançado de regeneração, assim como as transições entre elas (IBGE, 2004).

Figura 1. Área total da Mata Atlântica em amarelo claro, os fragmentos restantes em verde e os desmatamentos entre 2013-2014 em vermelho. Retirada do Atlas da SOS Mata Atlântica e INPE (2015).

O Estado de São Paulo possuía 80% de cobertura vegetal originalmente. Atualmente, possui 15,6 % de seu território ocupado por campos e florestas em diferentes estágios de conservação (SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2015). A região de estudo, chamada de Pontal do Paranapanema, era originalmente coberta por florestas e entremeadas por manchas de Cerrado (DIT^T, 2002). Segundo o inventário de cobertura vegetal (SIFESF, 2009), há na região 8,5% de vegetação no total, predominantemente Floresta estacional semidecidual (79,7%), condizente com a classificação vegetacional da região por Veloso et al. (1991).

2.2. Reservas Legais e Conservação da Biodiversidade

O direito a um ambiente ecologicamente equilibrado, que é um bem de uso comum e essencial à qualidade de vida, é direito de todos, segundo a Constituição Federal, de 1988, artigo 205, *caput*, sendo o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações impostos ao poder público e à coletividade (BRASIL, 1988). As leis ambientais são fundamentais para garantir que o mínimo de ambiente saudável seja preservado. No Brasil, a fim de frear a utilização dos recursos naturais de forma insustentável, em 1934 foram publicados os primeiros códigos Florestal e das Águas, que obrigavam os donos de terras a reservar um quarto do imóvel com mata natural. Posteriormente, as normas como as Áreas de preservação Permanente (APP) e Reserva Legal (RL) foram reincorporados ao Código Florestal de 1965. Este código passou por várias alterações até 2012, quando foi novamente alterado. A nova lei florestal brasileira passa por várias ações de inconstitucionalidade (ADIN) e ainda poderá ser revista, porém, no momento é a Lei vigente no território. A Lei Federal 12.651/12, dispõe sobre a proteção da vegetação nativa e alterou diversas leis, inclusive o código Florestal Lei nº 4.771, de 15 de setembro de 1965.

Está definido na Lei, no artigo 3º inciso III o conceito de Reserva Legal, tal como segue:

“III - Reserva Legal: área localizada no interior de uma propriedade ou posse rural, delimitada nos termos do art. 12, com a função de assegurar o uso econômico de modo sustentável dos recursos naturais do imóvel rural, auxiliar a conservação e a reabilitação dos processos ecológicos e promover a conservação da biodiversidade, bem como o abrigo e a proteção de fauna silvestre e da flora nativa;” (BRASIL, 2012).

O capítulo IV da referida lei regula as reservas legais (RL), sendo que o artigo 12 dispõe que todos imóveis rurais devem manter área com cobertura nativa e o percentual mínimo variando de região para região, sendo instituído no inciso II como sendo 20% para as regiões brasileiras, excetuadas a Amazônia Legal. O dispositivo 17, parágrafo 1º, admite a exploração de maneira sustentável da RL, enquanto no 21, que é livre a coleta de produtos florestais não madeireiros nas RL, observando-se algumas regras. Se o manejo tiver propósito comercial, deve-se obter autorização do órgão competente (art. 22), se não houver propósito comercial, independe de autorização, deve apenas ser declarado previamente ao órgão ambiental (art. 23) (BRASIL, 2012).

As Reservas Legais são instrumentos importantes para a implantação de corredores não ripários, para a formação de trampolins ecológicos e para aumentar a conectividade da paisagem, reduzindo os riscos de extinção (METZGER, 2003). Independentemente do tamanho da RL, são consideradas importantes por serem elementos da paisagem que deveriam promover ou auxiliar a conservação da biodiversidade, por poder favorecer fluxos biológicos entre Unidades de Conservação e reduzir o isolamento de grandes fragmentos (METZGER, 2010). Assim como, por proporcionar serviços ambientais, como o controle de pragas, o aumento de polinização e produtividade de algumas culturas (DE MARCO; COELHO, 2004). Considerando a teoria dos limiares ecológicos, de percolação e de fragmentação, especialmente o de fragmentação para as áreas com habitats já reduzidos, a presença de Reservas Legais se torna fundamental para manter a cobertura de vegetação acima de 30% indicado como limite mínimo para conciliar uso econômico e conservação biológica, para que os efeitos da fragmentação não se somem aos efeitos de perdas de habitat e ocasionem maiores perdas de biodiversidade (METZGER, 2010).

A região do Pontal do Paranapanema possui 112 assentamentos que ocupam uma área de 140.397,96 ha. Considerando que deste total, 20% deve ser para as RL's previstas na Lei, há no Pontal uma área de 28.079,59 ha pertencentes a RL, que pode ser conservada, restaurada e manejada (e-SIC, 2015).

2.3. O Pontal do Paranapanema

A região conhecida como Pontal do Paranapanema se localiza no extremo Oeste do Estado de São Paulo, na região Sudeste do Brasil. A delimitação da região pode ser variável, mas no presente estudo será considerada aquela utilizada pela Unidade de gerenciamento de recursos hídricos, utilizada também pelo Instituto Florestal (IF) para os mapas de vegetação (UGRHI) (Figura 2).

Figura 2. Localização da sub-região do Pontal do Paranapanema no Estado de São Paulo, destacada em preto. Fonte: Elaborado e retirado de Firetti et al. (2010).

O Pontal do Paranapanema possui 12.395 Km² localizado entre as coordenadas geográficas latitude 21° 45' S e 22° 45' S e longitude 51° W e 35° W. A região é composta por 32 municípios: Alfredo Marcondes, Álvares Machado, Anhumas, Caiuá, Emilianópolis, Euclides da Cunha Paulista, Iepê, João Ramalho, Marabá Paulista, Martinópolis, Mirante do Paranapanema, Nantes, Narandiba, Piquerobi, Pirapozinho, Presidente Bernardes, Presidente Epitácio, Presidente Prudente, Presidente Venceslau, Rancharia, Regente Feijó, Ribeirão dos Índios, Rosana, Sandovalina, Santo Anastácio, Santo Expedito, Taciba, Teodoro Sampaio, Caiabu, Indiana, Tarabai e Estrela do Norte (TERRITÓRIOS DA CIDADANIA, 2013).

É uma região com baixa densidade demográfica, uma das menos povoadas do Estado e a segunda região com o pior Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), atrás apenas do Vale do Ribeira. A região foi devastada ao longo do seu histórico de uso e ocupação do solo (LEITE, 1998; DITT, 2002), como pode ser observado pela figura 3.

Figura 3. Cobertura florestal da região do Pontal do Paranapanema de 1953 a 2003. Os rios estão em cinza escuro e a vegetação em cinza claro. Fonte: Retirado de UEZU (2006). Escala 1:1.000.000.

A região tem sofrido com o desmatamento, substituindo suas florestas nativas por pastagens e cultivos agrícolas, hoje restando aproximadamente 8,5% vegetação natural (SMA, 2009). O uso do solo é caracterizado pelo predomínio de áreas de pastagem, fragmentos florestais isolados, assentamentos rurais e áreas de cana-de-açúcar (DITT, 2002). O maior fragmento da região é o Parque Estadual Morro do Diabo (PEMD), com cerca de 35.000 hectares (DITT, 2002) e quatro fragmentos da Estação Ecológica do Mico-Preto (Figura 4).

Figura 4. Fragmentos na região do Pontal do Paranapanema, sendo o maior deles o Parque Estadual Morro do Diabo e os quatro fragmentos destacados formam a Estação Ecológica Mico-Leão-Preto. Fonte: site IPE.

A região está na província conhecida como Planalto Ocidental Paulista e o relevo é formado por planícies amplas, com baixa declividade. As formações geológicas predominantes são as areníticas do Grupo Bauru. A cobertura do solo predominante é de latossolos, além da elevada concentração de areias. As principais características são baixa fertilidade natural, boa permeabilidade e drenagem excessiva (ITESP, 1998).

O clima no pontal é predominantemente continental e, segundo a classificação de Köppen, são de dois tipos climáticos na região: Aw e Cwa (SMA, 1999; TORRES; SILVA JUNIOR, 2010). O Aw é o tropical úmido, caracterizado por estação chuvosa no verão e seca no inverno, com temperaturas médias entre 22°C e 24°C e precipitações pluviométricas em torno de 1500 mm. Já o Cwa é o mesotérmico de Inverno Seco, caracterizado por temperaturas médias em torno de 22°C, com chuvas de clima tropical com maiores ocorrências no verão.

Segundo Fernandes e Ramalho (2001) e Rodrigues et al. (2007) o Pontal é uma região marcada e conhecida por conflitos pela posse da terra. O processo histórico de colonização se deu de forma violenta pelos colonizadores em relação aos índios que viviam lá, provocando a expropriação e extermínio da população indígena (FERNANDES; RAMALHO, 2001). Os problemas de domínio da terra começam no Pontal a partir do século XIX, quando os títulos das terras se originavam nas escrituras paroquiais, no chamado Registro do Vigário e esse registro

possibilitava o posterior registro legal da propriedade (LEITE, 1999; DITT, 2002). Com a lei de Terras (entre 1850-1856), que permitia às pessoas com posses ou sesmarias que regularizassem suas terras, essas terras eram legalmente reconhecidas pelo Estado como propriedades privadas. O restante foi considerado terra devoluta e retornaram para posse do Estado, com objetivo de colonizar e estimular a imigração e o estabelecimento da agricultura (LEITE, 1999). Nessa época, houve a formação do grilo da Fazenda Pirapó-Santo Anastácio, com uma área de 238 mil alqueires (LEITE, 1999). Na década de 40, foram criadas três reservas florestais, porém os grileiros praticamente destruíram a Grande Reserva do Pontal (que possuía 247.000 ha de florestas) (LEITE, 1999; RODRIGUES et al., 2007). No governo de Adhemar de Barros, o estado renunciou à propriedade de quase metade das terras das Grande Reserva do Pontal, permitindo que ela fosse atravessada por uma ferrovia e nos governos posteriores as invasões continuariam (DITT, 2002). Ao longo dessa estrada de ferro foram sendo construídos centros urbanos, com o surgimento de vários títulos falsificados de propriedade da terra, o que mais tarde foi alvo de confrontos (LEITE, 1999; FERNANDES; RAMALHO, 2001). Com as ocupações do Movimento dos Trabalhadores Rurais Sem Terra (MST), a realidade começou a mudar e a luta pela terra na região teve um significativo impacto sócioterritorial (FERNANDES; RAMALHO, 2001).

E esta região, segundo informações fornecidas pelo Território da cidadania (2015), possui 5.823 famílias de assentados, que ocupam 1390 km² de terra no Pontal do Paranapanema, correspondendo a quase 12% da área total da região.

Atualmente, a paisagem da região estudada é composta de fragmentos florestais, sendo o maior deles o Parque estadual Morro do Diabo (33.845, 33 ha), em seguida, a Estação Ecológica Mico-Leão-Preto (6.680,62 ha) formada por quatro fragmentos na região.

Neste contexto de fragmentação e ocupação da região, a prática de cultivo em sistemas agroflorestais pode ser um meio de auxiliar na conservação da biodiversidade regional. Isto porque os sistemas agroflorestais são, basicamente, sistemas de uso da terra que integram espécies perenes lenhosas com culturas agrícolas e/ou pecuária em arranjos espaciais e temporais (ENGEL, 1999; SCHROTH et al., 2004; MAY; TROVATTO 2008) cujo principal objetivo é de otimizar o uso da terra, conciliando produção florestal com produção de alimentos e conservação do solo (ENGEL, 1999). Os SAF são apontados como sistemas sustentáveis promissores para solução de problemas no uso dos recursos naturais (ENGEL, 1999; SCHROTH et al., 2004), por poderem auxiliar a recuperação de fragmentos, para serem corredores de interligação, para auxiliarem no manejo de borda, fornecerem habitats para espécies tolerantes a distúrbios, ajudarem a reduzir taxas de conversão de habitat por menor pressão pelo uso da terra, fornecerem serviços ecossistêmicos como sequestro de carbono, melhoria da qualidade do ar, entre outros (AMADOR; VIANA, 1998; SCHROTH et al., 2004, NAIR, 2007; VIVAN, 2010). Benefícios socioeconômicos são também reconhecidos devido à diversificação de produção, do aproveitamento e reaproveitamento de recursos e do maior envolvimento dos agricultores com o sistema de produção (NAIR, 2007; VIVAN, 2010; MAY; TROVATTO, 2008).

2.4. Família Arecaceae - *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.

As palmeiras são monocotiledôneas da família Arecaceae, que segundo Sodré (2005) são plantas lenhosas que formam um grupo natural de plantas com morfologia característica. A distribuição das espécies concentra-se nas zonas úmidas em todo o planeta, sendo mais rara em regiões secas e frias (SODRÉ, 2005). Ainda segundo Sodré

(2005), a estimativa de número de espécies e gêneros é considerada polêmica, pois as quantidades oscilam entre 2.500 a 3.500 espécies, com aproximadamente 230 gêneros. Estimativas atuais afirmam que a família é representada por cerca de 2.700 espécies reunidas em mais de 240 gêneros (LORENZI, 2010). Segundo Mirisola Filho (2009), somente na região do Brasil Central há aproximadamente 11 gêneros de palmeiras e 44 espécies. A morfologia básica da família, segundo Sodré (2005), resume-se em: raízes do tipo fasciculadas, com várias espécies adultas apresentando pequenas raízes adventícias; o caule recebe o nome próprio de estipe e pode apresentar formas e tamanhos variados, que podem ser revestido ou não, termina em um meristema apical, protegido por folhas; as folhas podem ter tamanhos, formas e texturas variadas, geralmente constituídas por bainha, pecíolo, raque e lâmina; a bainha é a parte alargada do pecíolo que serve para a fixação ao estipe; as inflorescências geralmente não são muito chamativas, que surgem de uma estrutura, ramificada ou não, formada por três elementos: as brácteas (espata), a raque e as flores; os frutos são popularmente conhecidos como coquinhos, com variações nas formas, tamanhos e cores. A drupa é o tipo mais comum de frutos entre as palmeiras, que consiste em uma camada externa chamada de pericarpo, uma parte carnosa de espessura variável chamada de mesocarpo e uma rígida camada interna denominada endocarpo. A maior parte da semente é formada por um endosperma chamado albúmen. O embrião está imerso no endosperma, normalmente em um extremo.

Conforme afirmado por Lorenzi (2010), o gênero *Acrocomia* é composto por sete espécies, sendo que seis delas ocorrem em território nacional: *A. bassleri*, *A. emensis*, *A. glaucescens*, *A. totai*, *A. intumescens* e *A. aculeata*. O termo *Acrocomia* deriva do grego “*Akron*” (cume) e “*Kome*” (cabeleira), com significado relacionado a sua copa, devido a seu formato de coroa (NOVAES, 1952; LORENZI, 2010). Uma visão geral da palmeira pode ser observada na Figura 5.

Figura 5. Visão geral de um indivíduo de *Acrocomia aculeata* (macaúba) encontrado no Pontal do Paranapanema. Acervo pessoal, população Fusquinha.

A. aculeata é mais conhecida como macaúba ou bocaiúva, porém possui vários nomes populares como: coco-baboso, coco-de-catarro, coco-de-espinho, chiclete-de-baiano, macaiba, macajuba, macaúva, dependendo da região (LORENZI, 2010; CARVALHO et al., 2011). Recebe nomes diferentes de acordo com sua distribuição em outros países como: coyol (Costa Rica, Honduras e México), mbocayá (Argentina), corozo (Colômbia e Venezuela) (NOVAES, 1952; CARVALHO et al., 2011). É uma palmeira arbórea, nativa de florestas tropicais de ampla distribuição geográfica (SCARIOT et al., 1995). Ocorre desde a América Central até o sul da América do Sul (NOVAES, 1952; SCARIOT et al., 1995; MOURA, 2007) como pode ser observada na figura 6.

No Brasil, há ocorrência natural da espécie em quase todo o território, especialmente nas áreas menos colonizadas, sendo as maiores concentrações nos Estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (SILVA, 2007). Novaes (1952) afirmou que a macaúba se encontrava em condições naturais em várias regiões do Estado de São Paulo, porém foram sistematicamente substituídas primeiramente por lavouras de café, posteriormente por cana-de-açúcar e pastagens. Segundo Moura (2007), o principal habitat da espécie são regiões de vegetação aberta com alta incidência solar, sendo também reconhecida por ser indicadora de solos férteis e colonizadora de áreas devastadas, sendo muito frequente em regiões de pastagens.

Figura 6. Mapa da distribuição da *Acrocomia aculeata* (macaúba) no continente Americano e no Brasil. Fonte: Berton, 2013.

O estipe da macaúba pode atingir de 10 a 15 metros de altura e 30 a 40 cm de diâmetro médio (NOVAES, 1952; SILVA, 2007; CARVALHO et al., 2011). O estipe é ereto e cilíndrico, sem ramificações, com folhas aglomeradas no ápice e presença de cicatrizes foliares em sua extensão (SCARIOT et al., 1995; SILVA, 2007; CARVALHO et al., 2011). No estipe, a região dos nós é coberta de espinhos escuros e pontiagudos (SILVA, 2007). As folhas são compostas, pinadas e ordenadas em diferentes planos, dando aspecto plumoso à copa, de comprimento variando de 4 a 5 m, apresentam espinhos na região central (SODRÉ, 2005; LORENZI, 2006; CARVALHO et al., 2011, VIANNA, 2011) como pode ser observada na Figura 7A. Apresenta inflorescências em espádice, interfoliares e de coloração amarelada, agrupadas em cachos pendentes com comprimento entre 50-80 cm (SODRÉ, 2005; CARVALHO et al., 2011). A macaúba é uma palmeira monoica, as inflorescências possuem em

torno de 250 ráquias com flores unissexuais arrançadas em poucas tríades (3-6) na parte basal da ráquias (uma flor pistilada ladeada por duas flores estaminadas) e muitas flores estaminadas (300) da porção mediana até a parte apical da ráquila (SCARIOT et al., 1991; BRITO, 2013). As flores são unissexuais, de coloração amarelo claro (SCARIOT et al., 1991; SILVA, 2007; BERTON, 2013) (FIGURA 7 B). Segundo Brito (2013), a espécie possui dicogamia protogínica, ou seja, as flores femininas amadurecem primeiro que as flores masculinas. Os frutos são esféricos ou ligeiramente achatados, em forma de drupa globosa (SILVA, 2007) (FIGURA 7C). Quando maduros, possuem epicarpo duro e quebradiço, de coloração verde-amarelado; o mesocarpo é fibroso e mucilaginoso, com sabor adocicado, comestível e rico em glicerídeos, de coloração amarela; o endocarpo é fortemente aderido à polpa fibrosa, com parede óssea e enegrecida (SCARIOT et al., 1991; SILVA, 2007; LORENZI, 2010). A semente é oleaginosa, comestível e revestida por uma camada fina de tegumento (SCARIOT et al., 1991; SILVA, 2007; CARVALHO et al., 2011). Embora haja variações consideráveis entre as regiões de ocorrência, a composição média do fruto pode ser expressa, percentualmente, na base seca em 21% epicarpo, 38% mesocarpo, 34% endocarpo e 7% amêndoa (CARVALHO et al., 2011). A floração ocorre na estação chuvosa (BRITO, 2013) e a polinização é feita principalmente por coleópteros das famílias Curculionidae, Nitidulidae e Escarabaeidae e pelo vento (SCARIOT et al., 1991; HENDERSON et al., 1995; SCARIOT, 1998; BRITO, 2013). As abelhas que visitam a inflorescência possuem papel secundário na polinização, especialmente o gênero *Trigona* (SILVA, 2007; BRITO, 2013). A frutificação ocorre durante todo o ano e os frutos amadurecem, principalmente, entre setembro e janeiro (SCARIOT et al., 1991).

Os resultados por polinizações manuais indicaram sistema reprodutivo misto, mas com predominância de xenogamia, ou seja, a polinização cruzada corresponde a uma significativa porcentagem de produção de frutos, porém há autocompatibilidade (SCARIOT et al., 1991; BRITO, 2013).

Segundo Lorenzi (1992), a espécie tem características pioneiras, apresenta maior dispersão em formações secundárias, sendo facilitada pela grande produção de frutos que são consumidos pela fauna. Esta palmeira tem forte relação com a fauna, sendo que a dispersão das sementes é realizada por animais que se alimentam de seus frutos, como araras, capivaras, antas e emas (POTT; POTT, 1994; SCARIOT, 1998). Quando encontradas em áreas de pastagem, animais domésticos, como o gado, também colaboram com a dispersão (SCARIOT, 1998).

Os frutos são considerados o produto mais importante da planta, pois possuem grande potencial produtivo e todo ele pode ser aproveitado, podendo ser consumido in natura ou podem ser usados para a extração de gordura comestível e a amêndoa fornece um óleo claro com características parecidas com o óleo de oliva (BHERING, 2009; CARVALHO et al., 2011).

Figura 7. Visão geral da palmeira *Acrocomia aculeata* (macaúba), seu estipe e folhas (A), a espata e a inflorescência (B) e os cachos de frutos (C). Acervo pessoal.

2.5. Importância Econômica

As palmeiras são muito importantes do ponto de vista econômico e ecológico (LIMA, 2003). A espécie possui várias aplicações, principalmente no aproveitamento dos seus frutos (LORENZI, 2006). Lorenzi (2006) relatou usos pelas populações pantaneiras. Ela identificou nove categorias de usos, sendo que os frutos são a principal fonte de renda para a comercialização da espécie e deles podem ser aproveitados o endocarpo, a polpa (mesocarpo) e o endosperma. Além da obtenção de óleo, a polpa é comestível e pode ser consumida in natura ou na fabricação de conservas, licores ou doces caseiros (LORENZI, 2006; CARVALHO et al., 2011). O endocarpo pode ser aproveitado na fabricação de carvão vegetal (SILVA et al., 1986). A amêndoa também pode ter uso alimentício, já que tem alto valor proteico (HIANE et al., 2005). As folhas podem ser usadas na produção de ração animal para suplementação alimentar de bovinos e equinos (SANTOS et al., 1997). Há também relatos de usos medicinais e cosméticos (LORENZI, 2006).

Entretanto é a propriedade oleaginosa de seus frutos que desperta maior interesse, pois seus óleos podem ser aplicados em diversos setores. A alta produtividade, a adaptação às condições de baixa disponibilidade hídrica, a ampla distribuição geográfica, a aparente resistência a pragas e doenças, o hábito de crescimento que favorece a consorciação e a longevidade, sugerem uma condição de competitividade favorável em relação a oleaginosas tradicionais, principalmente em ambientes tropicais (SILVA, 1994; MOURA et al., 2010). Assim, a macaúba tem se destacado como uma das principais espécies oleaginosas nativas com potencial para utilização agroindustrial, especialmente visando à produção de biocombustíveis (CETEC, 1983; SILVA, 1994; TEIXEIRA, 2005; LORENZI,

2006; BANDEIRA, 2008; MOURA et al., 2010). No entanto, a instalação de cultivos comerciais de macaúba e a preservação de populações naturais envelhecidas são limitadas pelas dificuldades na propagação (BANDEIRA, 2008). As sementes da espécie apresentam dormência, de causa ainda desconhecida, o que faz com que a germinação, em condição natural e de viveiro, aconteça em baixos percentuais e com grande desuniformidade (SILVA, 1994; TABAI, 1992; CLEMENT et al., 2005; BANDEIRA, 2008), situação comum em palmeiras (BROSCHAT, 1998; SPERA et al., 2001). Outros problemas apontados para a utilização da macaúba são a longa fase juvenil (mais de 7 anos) e a quebra de dormência da semente (MOURA, 2007; PIMENTEL et al., 2013). Porém, pesquisas para melhorar a taxa de germinação e quebra da dormência da semente estão sendo realizadas (MOTOIKE et al., 2007; RIBEIRO et al., 2011; BERTON, 2013). A macaúba pode ser utilizada em consórcios com outras espécies até começar a produzir. Esta proposta de consórcio está sendo implantada no Pontal do Paranapanema pelo Projeto “Bioenergia com Biodiversidade e Segurança Alimentar, no Pontal do Paranapanema, utilizando Sistemas Agroflorestais” (do Grupo de Pesquisa em Desenvolvimento de Assentamentos Rurais e Agricultura Familiar da ESALQ/USP- financiado pelo MDA (Governo Federal)).

Pimentel et al. (2013) estudaram a rentabilidade e viabilidade de produção de óleo pela macaúba e concluíram que a atividade é rentável para o produtor rural e pode ser considerada uma cultura estratégica para fortalecer o Plano Nacional de Agroenergia. Além disso, o óleo extraído da macaúba possui alto valor de mercado em função da multiplicidade de uso industrial (TEIXEIRA, 2005). Segundo Bhering (2009), a produção de óleo pode chegar a 4.000 kg por hectare por ano e, se adotadas medidas de plantio racional e de melhoramento genético dessa espécie, esse valor poderia aumentar ainda mais. Para comparação, culturas tradicionais como a soja e a mamona produzem entre 500-700 kg de óleo por hectare por ano (BHERING, 2009) (Figura 8).

Hiane et al. (2005) verificaram diferenças na composição dos óleos da polpa e amêndoa. Enquanto o óleo da polpa é alaranjado com altas concentrações de vitamina A, o das amêndoas é transparente e possui familiaridades com o óleo de oliva, podendo substituí-lo na alimentação. Um dos problemas na produção de biodiesel é a geração de subprodutos como glicerina, farelo e tortas (TEIXEIRA, 2005), porém, as tortas geradas pela macaúba possuem alto valor energético e podem ser usadas como ração para animais domésticos e a torta gerada pela amêndoa também possui alta concentração de proteína, podendo ser usada para consumo humano. O endocarpo pode ser utilizado na produção de carvão, podendo ser até melhor que os de madeira de eucalipto (SILVA et al., 1986).

Figura 8. Representação da quantidade (kg) de óleo por hectare por ano, de diversas culturas oleaginosas. Figura de Berton, 2015.

2.6. Diversidade Genética

Segundo a Convenção de Diversidade Biológica - CDB, a diversidade biológica, ou diversidade, é definida como “a variabilidade entre organismos vivos de todas as origens compreendendo, dentre outros, os ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos de que fazem parte; compreendendo ainda a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas” (BRASIL, 1992). A diversidade genética é a variedade de alelos e genótipos no grupo de estudo e é necessária para as populações se adaptarem às mudanças ambientais (FRANKHAM et al., 2008). Ela engloba as informações sobre sequências de DNA, consequentemente, a estrutura do genoma, as diferenças e similaridades entre indivíduos de uma espécie incluindo especiações e as suas interações com os organismos que compõem as comunidades (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; VALOIS et al., 2001). Ela geralmente é descrita usando o polimorfismo, heterozigosidade esperada e heterozigosidade observada, sendo que as técnicas moleculares medem a diversidade em locos individuais (YOUNG et al., 1996; FRANKHAM et al., 2008).

Com o desenvolvimento da civilização humana, as paisagens naturais sofreram alterações antrópicas, resultando na transformação das áreas naturais em ambientes fragmentados, que modificaram a estrutura, distribuição e funcionamento dos ecossistemas naturais (SAUNDERS et al., 1991). Como consequências deste processo, incluem-se a perda de habitat, a formação de manchas remanescentes de habitat com várias formas e tamanhos, redução no tamanho das populações e aumento no grau de isolamento das populações remanescentes (MCGARIGAL; CUSHMAN, 2002; FAHRIG, 2003). Sala et al. (2000) consideram esses fatores como sendo os principais responsáveis pela perda da biodiversidade nos ecossistemas terrestres do planeta. Young et al. (1996) expõem que a fragmentação do habitat é uma ameaça significativa para a manutenção da biodiversidade e pode trazer sérias consequências genéticas. Com a redução de habitats, as populações diminuem de tamanho e aumenta o isolamento espacial entre elas levando à erosão genética (YOUNG et al., 1996).

A diversidade genética é necessária para as populações se adaptarem às mudanças e é o material no qual a seleção atua para permitir adaptação e evolução dos organismos (FRANKHAM et al., 2008). As forças evolutivas (mutação, migração, seleção e deriva genética) atuam nas populações influenciando a distribuição não aleatória dos alelos e genótipos no tempo e espaço (HAMRICK, 1982). Mutação, recombinação e fluxo gênico introduzem continuamente diversidade genética nas populações que pode ser perdida por deriva genética, endocruzamentos e seleção natural (NEI, 1987). A migração ou fluxo gênico promove a homogeneidade genética, enquanto a mutação, a deriva genética e a seleção favorecem adaptações às condições ambientais locais que podem levar à diferenciação genética de populações (FUTUYMA, 1992). Segundo Futuyma (1992), estas forças podem ser observadas ao se analisar os desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, que assume algumas premissas como, uma população de tamanho infinito, com cruzamentos ao acaso, com ausência total de migração, de mutação, de seleção e de deriva genética. As forças que geram e amplificam a variabilidade genética são fundamentais para o processo evolutivo e manutenção da espécie, já que a adaptação depende da existência da variabilidade sobre a qual a seleção possa atuar ao longo do tempo (FRANKHAM et al., 2008). Quando populações se mantêm isoladas ao longo de várias gerações, pode ocorrer seleção e endogamia, reduzindo a diversidade genética. A endogamia pode diminuir a fertilidade, aumentar a mortalidade de sementes e plântulas, reduzir a taxa de crescimento dos indivíduos e até levar as populações à extinção, por consequência do aumento dos genes deletérios (YOUNG et al., 1996).

A genética de populações tornou-se uma importante ferramenta para descrever a variação genética em populações e estudar os mecanismos de manutenção desta variabilidade (NEI, 1987). O conhecimento da variação

genética e de sua distribuição na população permite que as estratégias de melhoramentos sejam direcionadas, que os ganhos genéticos sejam maximizados e as populações sejam mais bem manejadas pelo uso racional e sustentável dos recursos, visando a sua conservação genética (DIAS; KAGEYAMA, 1991; GRIBEL, 2001, FRANKHAM et al., 2008).

A principal ferramenta para avaliar como a variabilidade está distribuída dentro e entre as populações são os marcadores moleculares (SEBBENN, 2001). Entre os marcadores moleculares, os microssatélites (SSR) são os que possuem todas as características desejáveis a serem utilizadas nesses estudos, por apresentarem alto polimorfismo, serem codominantes e seletivamente neutros (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Nas análises de variabilidade genética, utilizando marcadores microssatélites, geralmente utilizam-se os seguintes parâmetros: número de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada segundo equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e) e índice de fixação (F).

2.7. Marcadores moleculares microssatélites

Os microssatélites ou SSR (Sequências Simples Repetidas) são sequências de 1 a 6 nucleotídeos, repetidas lado a lado (in tandem) encontradas amplamente no genoma da maioria dos eucariotos e procariotos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; TÓTH et al., 2000); são uma grande fração do DNA não codificante e são relativamente raros em regiões codificantes de proteínas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; LI et al., 2002). Estes marcadores geralmente são considerados neutros, por não sofrerem pressão seletiva, porém, eles podem estar envolvidos na organização da cromatina, na regulação de processos metabólicos do DNA e na regulação da expressão de alguns genes (LI et al., 2002). Não se compreende muito bem ainda a dinâmica mutacional dos microssatélites, porém, eles estão sob alterações mutacionais em maiores taxas do que observadas nas outras partes do genoma (PINTO et al., 2001). Em geral, as mutações nos microssatélites são causadas por deslizamento (“slippage”) da DNA polimerase (TAUTZ; SCHLOTTERER, 1994) ou por permutação (“crossing-over”) (EISEN, 1999). Isso resulta em marcadores altamente polimórficos, multialélicos, que são muito úteis em estudos de genética (PINTO et al., 2001). Apesar da alta taxa de mutação desses marcadores, as regiões que flanqueiam os SSR geralmente são preservadas entre indivíduos da mesma espécie (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Isto possibilita que sejam desenvolvidos e selecionados *primers* específicos que amplificam os fragmentos contendo DNA repetitivo em todos os genótipos, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Eles podem ser classificados de acordo com o tipo de sequência repetida como perfeito, imperfeito, interrompido e composto (OLIVEIRA et al., 2006). Uma sequência perfeita é aquela que não é interrompida por qualquer base que não seja o motivo da repetição (ex. GAGAGAGAGAGAGA). Na sequência imperfeita, há uma interrupção de um par de bases que não pertence ao motivo (ex. GAGAGATAGAGAGA); já no interrupto, há uma pequena sequência dentro do motivo (ex. GAGAGATCGAGAGA). Um microssatélite composto contém duas sequências de repetição adjacentes diferentes (ex. TCTCTCTCGAGAGAGA) (OLIVEIRA et al., 2006). Segundo Varshney et al. (2005), as repetições de trinucleotídeos são as mais comuns, seguidas por dinucleotídeos e tetranucleotídeos. O dinucleotídeo AT/TA é o mais comum nas plantas, seguido de AA/TT e GA/CT, enquanto o menos comum em plantas é o GT/CA, mais comum em humanos (PINTO et al., 2001). Os locos diferem no número de unidades repetitivas de di-, tri- ou tetranucleotídeos, esta variação de tamanho é detectada por meio de PCR utilizando pares de *primers* flanqueadores de cada sequência repetida (POWELL et al., 1996; LEMES et al., 2003).

Os marcadores microssatélites possuem muitas vantagens no estudo de genética de populações, pois apresentam grande conteúdo informativo por loco, possuem alta diversidade alélica, e, por serem codominantes, possibilitam a identificação de indivíduos homozigotos e heterozigotos, sendo dessa forma utilizado em diversos estudos em genética de populações e permitem a quantificação dos efeitos da fragmentação de habitats e estabelecer estratégias para conservação (POWELL et al., 1996).

Como cada loco é definido por um par de iniciadores, nos heterozigotos há duas bandas enquanto nos homozigotos há só uma banda. Quando utilizado o sequenciador automático para realização das eletroforeses, a detecção e a estimativa do tamanho dos alelos (apresentados em forma de picos) de cada indivíduo são realizadas com o uso de programas computacionais como o GeneScan (APPLIED BIOSYSTEMS versão 3.7, 2001) e o Genotyper (APPLIED BIOSYSTEMS versão 2.0, 1996) (RAPOSO, 2007).

2.8. Estrutura genética

A migração ou fluxo gênico promove a homogeneidade genética, enquanto a mutação, a deriva genética e a seleção favorecem adaptações às condições ambientais locais que podem levar à diferenciação genética de populações (FUTUYMA, 1992). Fatores como mecanismos de dispersão de pólen e sementes, sistema de reprodução, distribuição espacial, tamanho efetivo e fatores ambientais podem influenciar ou direcionar a forma com que a diversidade genética está estruturada, ou seja, distribuída, gerando um maior grau de parentesco dentro dos grupos do que entre os grupos, afetando, assim, a diversidade genética das espécies (HAMRICK, 1982).

O termo estrutura genética, segundo Loveless e Hamrich (1984), é definido como a distribuição não casual de alelos ou genótipos no tempo e espaço. A estruturação pode se manifestar em diferentes escalas como populações e subpopulações (macroescala) ou intrapopulacional (microescala) chamados de estrutura genética espacial (EGE) (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

Há várias técnicas estatísticas que permitem caracterizar a estrutura genética das populações naturais, por meio de marcadores moleculares ou caracteres quantitativos. Com marcadores moleculares codominantes é possível utilizar três metodologias: estatísticas F de Wright (WRIGHT, 1965); análise da variância das frequências gênicas (COCKERHAM, 1969) e análise da diversidade genética em populações subdivididas (NEI, 1973). As três abordagens procuram verificar a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações, ou seja, são métodos utilizados para macroescala. Para a detecção de Estrutura Genética Espacial (EGE) intrapopulacional, geralmente são utilizadas as estimativas dos coeficientes de coancestria de Cockerham (COCKERHAM, 1969; VENCovsky, 1992).

2.9. Sistema de reprodução

O sistema de reprodução de uma espécie de planta é a forma como as populações recombina seus genes para formar uma geração descendente e determina como a informação genética é transferida de uma geração para outra (WRIGHT, 1921; SEBBENN, 2006). O conhecimento do sistema de reprodução de uma planta é de fundamental importância para programas de melhoramento, coleta de sementes de polinização aberta, e restauração florestal, por ser o sistema de transferência de informações genéticas (SEBBENN, 2002).

Segundo Sebbenn (2001) o sistema de reprodução pode, basicamente, ser caracterizado por dois modelos: o modelo aleatório e o modelo misto de reprodução. No modelo misto de reprodução, a taxa de cruzamento pode ser calculada baseada nos genótipos multiloco observados em progênies de mães conhecidas (RITLAND; JAIN, 1981). O modelo proposto por Ritland e Jain (1981) é o mais empregado em trabalhos recentes. As estimativas são obtidas por máxima verossimilhança, e admite que populações se reproduzem por autofecundações a uma taxa s e por cruzamentos aleatórios numa taxa t . As pressuposições básicas para sua aplicação são i) que o conjunto de pólen é homogêneo para os cruzamentos com todos os genótipos maternos; ii) que os alelos de diferentes locos segregam independentemente e iii) que os locos não são afetados pela seleção ou mutação entre o evento reprodutivo e a análise (RITLAND; JAIN, 1981). As estimativas dos parâmetros podem ser obtidas utilizando o programa MLTR (RITLAND, 2002).

Estudos sobre mecanismos de polinização e de sistemas de cruzamentos chegaram à conclusão que a maioria das espécies se reproduzia preferencialmente por fecundação cruzada e que as espécies possuíam mecanismos para evitar a autopolinização, como incompatibilidade ou assincronia das flores (BAWA et al., 1985).

A autocompatibilidade está presente em várias espécies de palmeiras e é uma estratégia que garante a persistência das espécies, mesmo na ausência de polinizadores (SILBERBAUER-GOTTSBERGER, 1990; SCARIOT et al., 1991; ASHBURNER et al., 2001; NAZARENO; REIS, 2012). Porém, há vários mecanismos para favorecer a predominância de fertilização cruzada entre os indivíduos, como a protoginia e protrandria, observada em diversas espécies de palmeiras (SILBERBAUER-GOTTSBERGER, 1990; NAZARENO; REIS, 2012). A macaúba é uma palmeira monoica, autocompatível e protogínica (SCARIOT et al., 1991; BRITO, 2013). A polinização da espécie ocorre principalmente por coleópteros e pelo vento, também ocorre por polinizadores secundários, como abelhas (SCARIOT et al., 1991; SCARIOT et al., 1995; BRITO, 2013). Estudos do sistema reprodutivo de macaúba, por polinizações manuais, indicaram que o sistema reprodutivo é misto, com predominância de xenogamia e que a espécie possui autocompatibilidade (SCARIOT et al., 1991; BRITO, 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Áreas de estudo

O estudo foi realizado com indivíduos pertencentes a populações naturais de macaúba encontradas em Reservas Legais de três assentamentos rurais na região do Pontal do Paranapanema. São elas: Fusquinha (FU), Padre Josimo (PJ) localizadas no município de Teodoro Sampaio, a população Gleba XV de Novembro (GB), no município de Rosana, e uma área de uma propriedade particular localizada na cidade de Amparo (AM) (Figura 9). Os indivíduos das populações estudadas estão organizados de forma a quase formar um maciço de macaúbas (Figura 10).

Figura 9. Mapa com os quatro pontos de coletas, três deles no Pontal do Paranapanema (FU, PJ e GB), extremo oeste do Estado de São Paulo e um em Amparo (AM). Acervo pessoal, mapa feito por Jefferson L. Polizel (2015).

Figura 10. As áreas de estudo apresentam macaúba com ocorrência espontânea, formando maciços praticamente homogêneos da espécie. (Acervo pessoal, área na Gleba XV de novembro).

O assentamento Fusquinha foi criado em 12 de dezembro de 2003 e se encontra no município de Teodoro Sampaio/SP. Este assentamento possui 46 famílias e uma área total de 1.081,77 ha e possui RL de 217,54 ha. O assentamento Padre Josimo foi criado em 23 de dezembro de 2003 e também se localiza no município de Teodoro Sampaio. Atualmente, lá vivem 96 famílias assentadas numa área de 2.290,19 ha sendo 461,89 ha de RL e 76,96 ha de APP. Já o assentamento Gleba XV de novembro foi criado em 14 de dezembro de 1984, encontra-se nos municípios de Rosana e Euclides da Cunha, possui 571 famílias assentadas numa área de 13.309,76 ha sendo 2.398,61 ha de RL. É o maior assentamento da região em área e número de famílias (PORTAL DE TRANSPARÊNCIA, 2015). A população localizada em Amparo é uma área de uma propriedade particular.

3.2. COLETA DE MATERIAL PARA ESTUDO

Para os estudos genéticos, foram coletadas folhas de 50 matrizes em cada um dos assentamentos escolhidos na região, além de 50 matrizes na população da cidade de Amparo. Dessa forma, nossa amostragem de adultos totalizou 200 indivíduos (matrizes). Todas as matrizes foram marcadas com plaquinhas metálicas numeradas e georreferenciadas. Com auxílio de podão, as folhas foram coletadas e colocadas em sacos de papel devidamente identificadas e acondicionadas em caixas de plástico com sílica para o transporte ao laboratório

LARGEA/ESALQ/USP) (Figura 11). Os indivíduos coletados e os locais de coleta estão representados na Figura 12.

Figura 11. As folhas foram coletadas com o auxílio de um podão (A), acondicionadas em sacos de papel e identificadas com o nome do local e no número da matriz (B) e armazenadas em caixas de plástico com sílica, para serem levadas ao laboratório. As matrizes foram marcadas com plaquinha e georeferenciadas. Acervo pessoal.

Figura 12. Distribuição espacial dos genótipos coletados nos assentamentos Gleba XV de novembro (município de Rosana), Padre Josimo e Fusquinha (município de Teodoro Sampaio) e uma propriedade particular na cidade de Amparo. Os indivíduos estão representados por pontos amarelos em cada área de coleta. Fonte: Acervo pessoal, mapa feito por Jefferson L. Polizel.

Para o estudo do sistema reprodutivo, a coleta de sementes foi realizada na população FU. Houve coleta de frutos de 20 matrizes que foram colocados em sacos ventilados e transportados em caixas de isopor acondicionadas sobre barras de gelo para garantir a temperatura amena durante o transporte para o Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas- LARGEA. Chegando ao laboratório, os frutos foram colocados em refrigeração até serem encaminhados para a germinação *in vitro*. O esforço de coleta foi para tentar garantir a amostragem sugerida por Ritland (2002), 300 progênies de 10 matrizes.

3.3. Germinação dos embriões

A primeira tentativa de se obter as progênies da espécie foi pela germinação das sementes no Instituto Agrônomo de Campinas- IAC, com aplicação do protocolo de germinação para macaúba, desenvolvido por Berton (2013). As sementes tiveram baixa taxa de germinação e não puderam ser utilizadas. Após isso, a tentativa foi a extração de DNA diretamente dos embriões, porém com a quantidade pequena de DNA e provável presença de outras substâncias, a genotipagem não foi possível. Desta forma, a fim de garantir os resultados, os embriões foram germinados *in vitro*.

As sementes foram extraídas dos frutos com auxílio de uma morsa, para quebrar o endocarpo, e os embriões foram extraídos da semente com auxílio de estilete e pinça. Foram inoculados 30 embriões por matriz, de 20 matrizes, totalizando 600 embriões inoculados.

Os embriões foram previamente submetidos à desinfestação final em concentrações de cloro ativo 2,5% por 5 minutos e, estes foram posteriormente enxaguados três vezes em água destilada e esterilizada (autoclavada a 121°C e 1 kgf.cm⁻² de pressão por 20 minutos). O cloro ativo foi obtido a partir da solução comercial de hipoclorito de sódio (solução comercial com aproximadamente 2,5% de cloro ativo). Depois de desinfetados, foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de sacarose 30 g.L⁻¹, pH 5,8 e semi-solidificado com 2,3 g.L⁻¹ de Phytigel™. O meio de cultura foi distribuído em frascos de 300 mL com 50 mL de meio, os quais foram autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1 kgf.cm⁻² de pressão. Depois de 15 dias da inoculação verificou-se que o material não apresentou proliferação de fungos ou bactérias. E após dois meses já apresentava a germinação de alguns embriões. Todos os testes germinativos foram feitos no laboratório de Fisiologia das Árvores do Departamento de Ciências Florestais, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ-USP, coordenado pelo Prof. Antônio Natal Gonçalves. Do total, 246 embriões germinaram.

3.4. Extração e quantificação de DNA

Os procedimentos laboratoriais de extração e quantificação de DNA foram realizados no Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas- LARGEA, no departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP).

O DNA do material foliar coletado dos indivíduos adultos foi extraído segundo o protocolo CTAB proposto por Doyle e Doyle (1990) com algumas modificações.

O protocolo possuiu as seguintes etapas: (1) Em tubos do tipo *eppendorf* de 2,0 mL devidamente identificados para cada amostra, foram adicionados 700 µL de tampão de extração CTAB a 3% com PVP 40 a 2% e mercaptoetanol a 3% e proteinase K a 10ug/L (pré-aquecido a 65°C) com cerca de 150 mg do tecido macerado com nitrogênio líquido, então agitados para ressuspender o tecido no tampão; (2) foram levados ao banho-maria (65°C) por uma hora, agitando-os manualmente a cada 10 minutos; (3) após serem retirados do banho-maria e resfriados até temperatura ambiente, foram adicionados aos tubos 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e agitados invertendo-os por pelo menos 50 vezes até fazer uma emulsão homogênea; (4) os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 14.000 rpm; (5) o sobrenadante de cada amostra foi transferido para um novo tubo também identificado; (6) foram adicionados 400 µL de isopropanol frio (mantido a -20°C) e homogeneizado suavemente; (7) os tubos foram armazenados em freezer (-20°C) por 24 horas; (8) posteriormente foram centrifugados durante 15 minutos a 14000 rpm para formação dos pellets; (9) foi descartado o máximo de sobrenadante invertendo os tubos sem perder os pellets; (10) estes foram lavados em 500 µL de etanol 70% por duas vezes e com 500 µL de etanol 95% por uma vez; (11) foi retirado o máximo de etanol dos tubos sem perder os pellets; (12) os tubos permaneceram à temperatura ambiente sobre bancada por uma noite para a secagem dos pellets; (13) cada pellet foi diluído de acordo com seu tamanho, variando de 40 µL a 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0) acrescido de RNase (15mg/mL) e armazenados a -20°C.

Para a extração do DNA dos 246 embriões germinados *in vitro* o protocolo de extração de DNA foi alterado, para melhorar a qualidade do DNA, a pedido do prestador de serviço de genotipagem. Foi utilizado o

protocolo de extração de DNA de plantas, com lavagem de sorbitol e extração com 3 x CTAB, do Laboratório de Genética Vegetal – EMBRAPA CENARGEN (RUSSELL et al., 2010, modificado por INGLIS; GRATTAPAGLIA, protocolo não publicado):

O protocolo possuiu as seguintes etapas: (1) Pesar 20-30 mg de amostra de tecido desidratado em sílica. Colocar o tecido em microtubo de 2 mL com tampa de rosca; (2) Adicionar 1ml de β -mercaptoetanol para cada 100 ml de tampão de sorbitol; (3) Adicionar 1 ml de tampão de sorbitol ao tecido foliar e duas bolinhas de meta, macerar no BIOSPEC; (4) centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos, descartar o sobrenadante; (5) Repetir a lavagem com tampão de sorbitol para amostras ruins ou com muito polissacarídeo; (6) Adicionar 0,2 ml de β -mercaptoetanol para cada 100 ml de tampão CTAB 3x; (7) Adicionar 700 μ l de tampão de extração CTAB 3x ao *pellet* de tecido e bater no BIOSPEC para misturar o tecido ao tampão; (8) Incubar os microtubos em banho-maria a 65°C durante 30-45 minutos (não mais do que isso para evitar a oxidação excessiva); (9) Retirar do banho-maria e deixar esfriar os microtubos por alguns minutos. Centrifugar a 13.000 rpm por 2 minutos visando *pelletar* o debris de tecido; (10) Transferir o sobrenadante aquoso (em geral entre 400-500 μ l) para um novo tubo de 1,5 ou 2 ml; (11) Acrescentar 700 μ l de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) ao sobrenadante e agitar por inversão durante 2 minutos; (12) Centrifugar 13.000 rpm por 10 minutos; (13) Recuperar 300 μ l de sobrenadante sem perfurar a interface e transferir para outro microtubo; (14) Acrescentar 30 μ l de acetato de amônio 7.5 M e 200 μ l de isopropanol gelado e manter a -20°C por, no mínimo, 2 horas ou preferencialmente por toda noite Centrifugar a 13.000 rpm por 10 minutos; (15) Descartar o sobrenadante e lavar o *pellet* com 1 ml de etanol 70% uma vez, centrifugar por 1 minuto; (16) Descartar o etanol 70% (cuidado para não perder o *pellet*) e adicional 1 ml de etanol 95%, incubar por 10 minutos. Centrifugar por 1 minuto. Remover o etanol e deixar o *pellet* secar a temperatura ambiente por 1 hora. E acrescentar 50-100 μ L de tampão TE (modificação foi acrescentado apenas 30 μ L).

A quantificação do DNA presente nas amostras foi feita por meio da análise comparativa de cada amostra com amostras de DNA de concentração conhecida (DNA λ), com concentrações crescentes de 20, 100 e 300 ng/ μ L, submetidos à eletroforese (80V e 41mA) durante 30 minutos em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

3.5. Genotipagem

O material extraído das matrizes foi diluído a 20 ng/ μ L em 200 μ L. Já o material extraído dos embriões não foi diluído. Posteriormente, as amostras foram encaminhadas para genotipagem em uma empresa especializada (Heréditas-Tecnologia em Análise de DNA LTDA).

As reações de amplificação foram realizadas em um aparelho termociclador *Programmable Thermal Controller* - 100 (*MJ Research Inc.*), com as nove sequências de locos dos marcadores microssatélites. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em Sequenciador Applied Biosystems® modelo ABI 3130XL Genetic Analyzer. Os dados genéticos foram exportados do sequenciador automático, com os alelos declarados com precisão de duas casas decimais por meio do software Genotyper®. Dos oito locos publicados por Nucci et al. (2008), apenas quatro amplificaram para as amostras do trabalho. A fim de completar nove marcadores para o estudo, cinco marcadores não publicados foram utilizados (GRATTAPAGLIA, D., comunicação pessoal, 2016) (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências dos nove locos de microssatélites utilizados para a genotipagem dos indivíduos de *Acrocomia aculeata* nas populações Fusquinha, Padre Josimo, Gleba XV de novembro e Amparo.

Loco	Sequência dos pares de locos	Amplitude (pb)
Aacu07*	F:ATCGAAGGCCCTCCAATACT R:AAATAAGGGGACCCTCCAA	153-177
Aacu12*	F:GAATGTGCGTGCTCAAAATG R:AATGCCAAGTGACCAAGTCC	190-202
Aacu26*	F:ACTTGCAGCCCCATATTTCAG R:CAGGAACAGAGGCAAGTTC	273-316
Aacu30*	F:TGTGGAAGAAACAGGTCCC R:TCGCCTTGAGAAATTATGGC	148-158
MAC245**	F:TAGACAAAGCCGCATGTGTG R:GCAGTTGTTGGAGAAGAGGC	101-143
MAC115**	F:CTGCTAGCTCCTGTTTGCC R:CACAACCAGCATGAACACGG	161-199
MAC201**	F:AAGATGCGGAACAACATGGG R:TCACAGTTGATTCCGCTTGC	277-319
MAC240**	F:TGCAAGGTGTGTCAAAGGTG R:CGCAGTTATCACCCACCC	241-296
MAC23**	F:TTAGGACTCGTGTGTGGTTCG R:GGAAACGAGAAAGGCATCGG	229-247

*- Locos publicados por Nucci et al. (2008); **- Locos não publicados, comunicação pessoal, Grattapaglia, D (2016).

3.6. Análise de dados

3.6.1. Análise de desequilíbrio de ligação

O teste de desequilíbrio de ligação foi realizado utilizando o programa FSTAT (GOUDET, 1995). A hipótese H_0 foi testada e a probabilidade do teste foi utilizada para determinar o desequilíbrio entre todos os pares de locos. Para evitar falsos positivos, utilizou-se uma correção de Bonferroni para 95% de probabilidade ($\alpha=0,05$).

3.6.2. Análise da diversidade genética, endogamia e diferenciação genética entre e dentro de populações

As frequências alélicas e diversidade genética intrapopulacional foram caracterizadas para os indivíduos adultos por meio dos índices: número de alelos por loco ($\hat{A}$), heterozigosidade observada ($\hat{H}_o$) e heterozigosidade esperada segundo as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\hat{H}_e = 1 - \sum p_i^2$). A significância estatística da

estimativa do índice de fixação $\hat{F}$ foi verificada utilizando o método de permutação (1.000 repetições). Estas estimativas foram realizadas utilizando o programa FSTAT (GOUDET, 2001).

As estatísticas $\hat{F}$ ($\hat{F}_{IS}$, $\hat{F}_{IT}$ e $\hat{F}_{ST}$) de Wright (1951) podem ser utilizadas como parâmetro de diferenciação genética entre e dentro das subpopulações. Onde, $\hat{F}_{IT} = 1 - \left(\frac{H_o}{H_T} \right)$ pode ser considerado como um estimador de diversidade total da população e pode ser dividida em $\hat{F}_{IS} = 1 - \left(\frac{H_o}{H_e} \right)$, a diversidade dentro dos indivíduos em relação às subpopulações, e $\hat{F}_{ST} = 1 - \left(\frac{H_o}{H_T} \right)$, a diversidade devido à diferenciação entre as subpopulações (FRANKHAM et al., 2008). O estimativa das estatísticas F foi realizado utilizando o software POPGENE versão 1.32 (YEH et al., 1999).

3.6.3. Estrutura genética espacial

A distribuição espacial intrapopulacional dos genótipos das árvores adultas das populações foi realizada utilizando-se a estimativa do coeficiente de coancestria entre pares de árvores ($\hat{\theta}_{xy}$) (LOISELLE et al., 1995). O coeficiente de coancestria mede a extensão da similaridade entre os indivíduos x e y, relativo à similaridade genética média entre dois indivíduos aleatórios da amostra (HARDY; VEKEMANS, 2002). O melhor estimador pode ser definido para cada k -ésimo alelo do l -ésimo loco em cada par de indivíduos, x e y, como:

$$\hat{\rho}_{xy} = \left[\frac{\sum_l \sum_k (p_{xlk} - \bar{p}_{lk})(p_{ylk} - \bar{p}_{lk})}{\sum_l \sum_k \bar{p}_{lk}(1 - \bar{p}_{lk})} \right] + \left[\sum_l \frac{1}{(2n_l - 1)} \right]$$

em que p_{xlk} e p_{ylk} são as frequências do alelo k no loco l no indivíduo x e y, respectivamente (assumindo valores de zero (homozigotos para alelos alternativos), 0,5 (heterozigotos) e 1 (homozigotos para o alelo em consideração). $\bar{p}_{lk}$ é a frequência média do alelos k no loco l na população amostrada, em que n_l é o número de alelos existentes no loco l (número de indivíduos multiplicados pelo nível de ploidia, menos o número de alelos não amplificados) (LOISELLE et al., 1995).

Para visualizar a estrutura genética espacial, os valores de $\hat{\theta}_{xy}$ foram estimados para a média de pares de indivíduos dentro de classes de distância determinadas. Para testar se os valores médios eram significativamente diferentes de zero, o intervalo de confiança a 95% de probabilidade foi calculado para cada valor observado em cada classe de distância, usando permutação (1.000 repetições) de indivíduos diferentes classes de distância. O intervalo de confiança foi usado para construir os correlogramas de cada população analisada. Estas análises foram conduzidas utilizando o programa SPAGEDI versão 1.3.

3.6.4. Sistema de reprodução

A análise do sistema de reprodução da *A. aculeata* foi realizada com base no modelo misto de reprodução (RITLAND e JAIN, 1981) e modelo de cruzamentos correlacionados (RITLAND, 1989), utilizando o software MLTR (RITLAND, 2002). As estimativas foram feitas assumindo que as progênes são resultados de uma mistura de cruzamentos aleatórios e de autofecundação, suas pressuposições básicas são: 1-o conjunto de pólen é homogêneo para os cruzamentos com todos os genótipos maternos (não influencia tanto quando utilizado mais de 4-5 locos); 2- os alelos de diferentes locos segregam independentemente e; 3- os locos não são afetados pela seleção ou mutação entre o evento reprodutivo e a análise (RITLAND; JAIN, 1981; RITLAND, 1990). Os parâmetros estimados foram: taxa de cruzamento multilocos ($\hat{t}_m$), taxa de cruzamento unilocos ($\hat{t}_s$) e taxa de cruzamento entre parentes ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$), correlação de autofecundação ($\hat{r}_s$), a correlação multiloco de paternidade ($\hat{r}_{p(m)}$). O intervalo de confiança de 95% das estimativas foi obtido por 1.000 *bootstraps*. Outros parâmetros foram estimados: número efetivo de doadores de pólen ($\hat{N}_{ep} = 1/\hat{r}_{p(m)}$) e coancestria dentro de progênie ($\Theta = 0,125(1 + F_p)[4s + (t_m + st_m r_s)(1 + r_{p(m)})]$), onde $\hat{F}_p$ é o coeficiente de endogamia parental) (RITLAND, 1989). As frequências de Irmãos de autofecundação ($\hat{P}_{SS} = \hat{s}^2$), meio-irmãos ($\hat{P}_{HS} = \hat{t}_{HS}^2 (1 - \hat{r}_{p(m)})$), irmãos completos ($\hat{P}_{FS} = \hat{t}_m^2 \hat{r}_{p(m)}$), irmãos de autofecundação e cruzamento ($\hat{P}_{SHS} = 2\hat{s}\hat{t}_m$) e tamanho efetivo ($\hat{N}_e$) (SEBBENN, 2016; TAMBARUSSI et al., 2016). E o número de árvores matrizes para coleta de sementes estimado com base no tamanho efetivo de referência de 150 ($m = N_{e(ref)} / \hat{N}_e$) (SEBBENN, 2016).

4. RESULTADOS

4.1. Extração e quantificação de DNA

Para a realização das análises com os locos microssatélites, foi realizada a extração do DNA genômico a partir de cerca de 150 mg de tecido vegetal armazenados em recipientes contendo sílica gel. O método utilizado foi o CTAB descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998) modificado. A modificação constou de tratamento dos *pellets*, pois estes apresentaram cor escura e na quantificação houve um “rastro” que admitimos ser oxidação intensa, por isso, houve necessidade de aumentar a quantidade de PVP40 para 2%, mercaptoetanol para 3%, a fim de reduzir a oxidação, melhorar a qualidade do DNA e o “rastro” de oxidação na quantificação.

A quantificação do DNA presente nas amostras foi feita por meio da análise comparativa de cada amostra com amostras de DNA de concentração conhecida (DNA λ), submetidos à eletroforese (80 V e 41 mA) durante 30 minutos em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Este método se mostrou bastante eficiente para se ter uma grande quantidade de DNA e de boa qualidade, ou seja, sem compostos secundário, RNA's e rastros de oxidação (Figura 13).

Figura 13. Exemplo de géis de agarose de quantificação de DNA foliar dos indivíduos de *Acrocomia aculeata*.(A). E de DNA dos embriões germinados *in vitro* (B). As três primeiras colunas apresentam concentrações ascendentes de λ DNA: 20, 100, e 300 ng/ μ L respectivamente, em ambos. Fonte: Acervo pessoal.

4.2. Desequilíbrio de ligação

O teste de equilíbrio de ligação foi realizado para os 200 indivíduos adultos, utilizando o programa FSTAT (GOUDET, 2001). Já que para serem utilizados sem viés não podem estar ligados (SILVA, 2001; MARTINS, 2005). Dos 144 testes realizados, cinco pares de locos (MAC245xMAC202; MAC115xMAC201; MAC115xMAC240; MAC201xMAC240 e MAC201xMAC23) apresentaram algum grau de desequilíbrio de ligação, correspondendo a 3,48% (Tabela 2). Após a correção de Bonferroni ($\alpha=0,05$) considerou-se que não há ligação entre os locos.

Tabela 2. Desequilíbrio de ligação entre os quatro locos para as quatro populações de *Acrocomia aculeta*. O valor limite de significância após a correção de Bonferroni é 0,00035.

Par de locos	Fusquinha	Padre Josimo	Gleba XV	Amparo-SP
Aacu30 X Aacu26	0,97396	0,28472	0,34931	0,06597
Aacu30 X Aacu07	0,56493	0,79132	1,00000	0,74063
Aacu30 X Aacu12	0,54306	0,65486	0,28299	0,20625
Aacu30 X MAC245	0,90243	0,31458	0,76319	0,34965
Aacu30 X MAC115	0,34583	0,69514	0,83264	0,26424
Aacu30 X MAC201	0,63854	0,85382	0,62326	0,02188
Aacu30 X MAC240	0,49340	0,97917	0,80278	0,84896
Aacu30 X MAC23	0,30417	0,15104	0,55660	0,05972
Aacu26 X Aacu07	0,94861	0,47917	0,69965	1,00000
Aacu26 X Aacu12	0,41285	0,56910	0,88264	0,97326
Aacu26 X MAC245	0,17049	0,04514	0,94653	0,69063
Aacu26 X MAC115	0,49583	0,92326	0,56389	0,73889
Aacu26 X MAC201	0,23681	0,30799	0,42743	0,86701
Aacu26 X MAC240	0,98403	0,77083	0,10833	0,94826
Aacu26 X MAC23	0,01632	0,47361	0,34722	0,99375
Aacu07 X Aacu12	0,66736	0,66389	0,66076	0,29097
Aacu07 X MAC245	0,90174	0,09792	1,00000	0,47535
Aacu07 X MAC115	1,00000	0,17882	0,47153	0,46528
Aacu07 X MAC201	0,63681	0,85556	1,00000	1,00000
Aacu07 X MAC240	0,53229	0,21563	0,38750	0,72535
Aacu07 X MAC23	0,65660	0,44514	0,74340	1,00000
Aacu12 X MAC245	0,39826	0,37222	0,06042	0,31181
Aacu12 X MAC115	0,66389	0,58368	0,64653	0,84653
Aacu12 X MAC201	0,90868	0,51424	0,18576	0,90799
Aacu12 X MAC240	0,22674	0,62153	0,82431	0,53750
Aacu12 X MAC23	0,10660	0,98194	0,31111	0,89688
MAC245 X MAC115	0,31354	0,17639	0,03924	0,00347
MAC245 X MAC201	0,05313	0,57674	0,01528	0,00035*
MAC245 X MAC240	0,50729	0,24583	0,08889	0,00833
MAC245 X MAC23	0,25278	0,82569	0,44896	0,00139
MAC115 X MAC201	0,71771	0,01979	0,13646	0,00035*
MAC115 X MAC240	0,66076	0,65972	0,02292	0,00035*
MAC115 X MAC23	0,15313	0,98299	0,42222	0,00590
MAC201 X MAC240	0,58229	0,76493	0,03646	0,00035*
MAC201 X MAC23	0,24201	0,16806	0,06944	0,00035*
MAC240 X MAC23	0,49479	0,00208	0,99653	0,00069

* $P < 0,05$,

4.3. Análise da diversidade genética, índice de fixação e diferenciação genética entre e dentro de populações

As populações de macaúba estudadas apresentaram níveis relativamente altos de polimorfismo. Dos 103 alelos totais encontrados nos nove locos microssatélites, os maiores números de alelos totais ($\hat{A}_T$) foram 19 (loco Aacu12), seguido por 18 (loco MAC240) e 17 alelos (loco MAC245) (Tabela 3). A população que apresentou maior quantidade de alelos por loco ($\hat{A}$) foi a AM com 15 alelos para o loco MAC245. Considerando todos os locos analisados, a população que teve mais alelos foi a GB com 67 alelos. As outras três populações apresentaram 56 (FU), 58 (PJ) e 59 (AM) alelos, respectivamente. A população da GB apresentou maior diversidade alélica para os nove locos, com média de 7,44. Considerando todas as populações, o $\hat{A}$ variou de 2 a 15 alelos, com média de 6,22; 6,44; 7,44 e 6,55 para as populações FU, PJ, GB e AM, respectivamente.

Do $\hat{A}$ total, por população, 22, 27, 28 e 30 são alelos raros ($P < 0,05$) nas populações FU, PJ, GB e AM, respectivamente. Entre o total de alelos, 34 eram alelos privados, distribuídos em oito, sete, 11 e oito nas populações de FU, PJ, GB e AM, respectivamente (Tabela 4). Somente três alelos privados não eram raros, dois na população AM e um na população GB. Na população AM houve presença de oito alelos privados e a ausência de nove alelos que se encontram presentes nas outras três populações localizadas na região do Pontal do Paranapanema (ANEXO 1).

A heterozigosidade observada ($\hat{H}_o$) variou de 0,120 a 0,860; de 0,122 a 0,780; de 0,020 a 0,780 e de 0,020 a 0,880 nas populações de FU, PJ, GB e AM, respectivamente. A $\hat{H}_o$ média foi de 0,531; 0,482; 0,508; 0,410 para FU, PJ, GB e AM, respectivamente. A heterozigosidade esperada ($\hat{H}_e$) variou de 0,114 a 0,847; de 0,118 a 0,804; de 0,020 a 0,824 e de 0,020 a 0,836 nas populações FU, PJ, GB e AM, respectivamente. A $\hat{H}_e$ média foi de 0,554; 0,547; 0,615; 0,567 para FU, PJ, GB e AM, respectivamente (Tabela 3).

A população GB foi a que teve o $\hat{H}_e$ maiores que o $\hat{H}_o$ em quase todos os locos, exceto para o loco Aacu07, que foi igual ($\hat{H}_o = \hat{H}_e = 0,200$) e para o loco MAC23 que foi quase igual ($\hat{H}_o = 0,700$ e $\hat{H}_e = 0,696$). Estes resultados sugerem um excesso de indivíduos homozigotos em relação ao modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O índice de fixação ($\hat{F}$) apresentou valores positivos e significativos nos totais das populações PJ (0,119), GB (0,173) e AM (0,276). Valores positivos e significativos também foram encontrados no loco no loco MAC115 de três das quatro populações (PJ, GB e AM) e no loco MAC201 das populações PJ e GB (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros genéticos calculados para nove locos microssatélites desenvolvidos para *A. aculeata*: alelos totais ($\hat{A}_T$), tamanho da amostra para cada população (n), número de alelos ($\hat{A}$), heterozigosidade esperada ($\hat{H}_e$), heterozigosidade observada ($\hat{H}_o$) e índice de Fixação ($\hat{F}$).

Locos	$\hat{A}_T$	Fusquinha (n= 50)				Padre Josimo (n= 50)				Gleba XV (n= 50)				Amparo (n= 50)			
		$\hat{A}$	$\hat{H}_o$	$\hat{H}_e$	$\hat{F}$	$\hat{A}$	$\hat{H}_o$	$\hat{H}_e$	$\hat{F}$	$\hat{A}$	$\hat{H}_o$	$\hat{H}_e$	$\hat{F}$	$\hat{A}$	$\hat{H}_o$	$\hat{H}_e$	$\hat{F}$
Aacu30	7	4	0,260	0,239	-0,089	4	0,180	0,204	0,019	6	0,440	0,539	0,183	4	0,540	0,676	0,201
Aacu26	9	4	0,641	0,666	0,038	5	0,660	0,642	-0,028	6	0,580	0,667	0,131	5	0,540	0,674	0,199
Aacu07	4	2	0,120	0,114	-0,054	3	0,122	0,118	-0,038	2	0,020	0,020	0	2	0,020	0,020	0
Aacu12	19	11	0,734	0,704	-0,043	10	0,780	0,754	-0,035	11	0,714	0,813	0,122	6	0,280	0,571	0,509
MAC245	17	7	0,800	0,807	0,009	8	0,760	0,804	0,055	12	0,740	0,824	0,102	15	0,880	0,836	-0,053
MAC115	12	5	0,160	0,224	0,285	7	0,260	0,399	0,348*	8	0,300	0,564	0,468*	8	0,061	0,777	0,921*
MAC201	8	5	0,559	0,632	0,115	7	0,260	0,543	0,521*	5	0,300	0,615	0,512*	3	0,140	0,232	0,396
MAC240	18	10	0,860	0,847	-0,015	8	0,735	0,760	0,033	13	0,780	0,796	0,02	11	0,612	0,721	0,151
MAC23	9	8	0,640	0,749	0,145	6	0,579	0,699	0,171	4	0,700	0,696	-0,006	5	0,620	0,595	-0,042
Média	11,4	6,222	0,531	0,554	0,043	6,444	0,482	0,547	0,127	7,444	0,508	0,615	0,170	6,556	0,410	0,567	0,254
SD	5,4	2,991	0,280	0,281	0,119	2,186	0,272	0,252	0,193	3,812	0,260	0,247	0,193	4,157	0,296	0,268	0,315
Total	103	56	-	-	0,042	58	-	-	0,119*	67	-	-	0,173*	59	-	-	0,276*

*P<0,05

Tabela 4. Locos microssatélites analisados para *Acrocomia aculeata* nas populações Fusquinha (FU), Padre Josimo (PJ), Gleba XV (GB) e Amparo (AM)., Alelos totais por loco ($\hat{A}_T$), alelo por loco ($\hat{A}$), alelo raro ($\hat{A}_r$), alelo raro e privados ($\hat{A}_{rp}$) e alelo privado ($\hat{A}_p$).

Locos	$\hat{A}_T$	FU			PJ			GB				AM			
		$\hat{A}$	$\hat{A}_r$	$\hat{A}_{rp}$	$\hat{A}$	$\hat{A}_r$	$\hat{A}_{rp}$	$\hat{A}$	$\hat{A}_r$	$\hat{A}_{rp}$	$\hat{A}_p$	$\hat{A}$	$\hat{A}_r$	$\hat{A}_{rp}$	$\hat{A}_p$
Aacu30	7	4	1	0	4	2	0	6	1	0	1	4	1	0	0
Aacu26	9	4	1	0	5	0	1	6	2	1	0	5	1	0	1
Aacu07	4	2	0	0	3	1	1	2	1	0	0	2	1	0	1
Aacu12	19	11	5	2	10	3	2	11	2	4	0	6	1	2	0
MAC245	17	7	1	0	8	3	0	12	4	1	0	15	5	4	0
MAC115	12	5	3	0	7	3	1	8	2	1	0	8	4	0	0
MAC201	8	5	1	1	7	2	2	5	2	0	0	3	1	0	0
MAC240	18	10	1	2	8	3	0	13	4	3	0	11	8	0	0
MAC23	9	8	1	3	6	3	0	4	0	0	0	5	2	0	0
Total	103	56	14	8	58	20	7	67	18	10	1	59	24	6	2

Utilizando as estatísticas F para descrever a partição da diversidade genética dentro e entre populações, os valores para as populações foram $\hat{F}_{IS} = 0,1439$, $\hat{F}_{ST} = 0,1680$ e $\hat{F}_{IT} = 0,2877$. Ou seja, as populações possuem 16,8% de diferenciação genética. Desta forma, 83,2% da diversidade se encontra dentro das populações.

4.4. Estrutura genética espacial

Apenas na população FU não houve a presença de estrutura genética espacial (EGE) significativa (FIGURA 14 A).

Na população GB a EGE foi significativa até 38 metros. Foram observados valores de parentesco entre pares de plantas de $\hat{\theta}_{xy} = 0,0182$ a $\hat{\theta}_{xy} = 0,0418$ (Figura 14 B).

Na população PJ a EGE foi significativa até 810 metros com indivíduos possuindo grau de parentesco de $\hat{\theta}_{xy} = 0,0211$. (Figura 14 C).

Na população AM, a EGE foi observada até 71 metros ($\hat{\theta}_{xy} = 0,0213$ a $\hat{\theta}_{xy} = 0,0934$) (Figura 14 D).

Figura 14. Estrutura genética espacial nas populações FU (A), GB (B), PJ (C) e AM (D) de *Acrocomia aculeata*. A linha contínua se refere a estimativa do coeficiente de coancestria médio e as linhas pontilhadas se referem à estimativa do intervalo de confiança do erro de 95%. Fonte: Acervo pessoal.

4.5. Sistema Reprodutivo

A taxa de cruzamento multilocos ($\hat{t}_m$) foi 0,97 (IC: 0,996 a 0,973). A taxa de cruzamento unilocos ($\hat{t}_s$) foi 0,928 (IC: 0,27 a 0,949). A taxa de cruzamento entre parentes ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$) foi 0,042 (IC: 0,024 a 0,043). A correlação de autofecundação ($\hat{r}_s$) foi 0,1 (IC: 0 a 0,1). A correlação multiloco de paternidade ($\hat{r}_{p(m)}$) foi 0,015 (IC: 0,005 a 0,0013), número efetivo de doadores de pólen ($\hat{N}_{ep}$) foi 66,66 (IC: 76,92 a 200). As porcentagens de Irmãos de autofecundação ($\hat{P}_{SS}=0,09\%$), meio-irmãos ($\hat{P}_{HS}=92,67\%$), irmãos completos ($\hat{P}_{FS}=1,41\%$), irmãos de autofecundação e cruzamento ($\hat{P}_{SHS}=5,82\%$). A coancestria dentro de progênie ($\hat{\Theta}$) foi 0,134 (IC: 0,134 a 0,135), tamanho efetivo ($\hat{N}_e$) foi 3,10 (IC: 3,09 a 3,12) e número de árvores matrizes para coleta de sementes (m)=48,29 (IC:48,06 a 48,3). As únicas estimativas fora do IC foram $\hat{r}_{p(m)}$, $\hat{N}_{ep}$ e $\hat{P}_{FS}$ (Tabela 5)

Tabela 5- Parâmetros do Sistema de reprodução de *Acrocomia aculeata* para a População Fusquinha, Pontal do Paranapanema, SP (IC é o intervalo de confiança calculado por 1.000 bootstraps).

<i>Parâmetros</i>	<i>Fusquinha</i> <i>média (95% IC)</i>
Taxa de cruzamento multiloco: $\hat{t}_m$	0,97 (1,00 a 0,97)
Taxa de cruzamento uniloco: $\hat{t}_s$	0,93 (0,93 a 0,95)
Cruzamento entre parentes: $\hat{t}_m - \hat{t}_s$	0,04 (0,02 a 0,04)
Correlação de autofecundação: $\hat{r}_s$	0,10 (0,00 a 0,10)
Correlação Multilocus de paternidade: $\hat{r}_{p(m)}$	0,02 (0,00 a 0,01)
Número efetivo de doadores de polen: $\hat{N}_{ep}$	66,66 (76,92 a 200)
Irmãos de autofecundação: $\hat{P}_{SS}$ (%)	0,10 (0,07 a 0,11)
Meio-irmãos: $\hat{P}_{HS}$ (%)	92,67 (92,10 a 94,20)
Irmãos completos: $\hat{P}_{FS}$ (%)	1,41 (0,47 a 1,21)
Irmãos de autofecundação e cruzamento: $\hat{P}_{SHS}$ (%)	5,82 (5,25 a 6,57)
Coancestria dentro de progenies: $\hat{\Theta}$	0,13 (0,13 a 0,14)
Tamanho efetivo: $\hat{N}_e$	3,10 (3,09 a 3,12)
Número de árvores matrizes para coleta de sementes: $\hat{m}$	48,29 (48,06 a 48,3)
IC: 95%	

5. DISCUSSÃO

5.1. Desequilíbrio de ligação

Apesar de cinco testes significativos no teste de desequilíbrio de ligação, a porcentagem deste desequilíbrio foi baixa (3,48%) e estão concentrados em uma só população (AM). Neste caso, este desequilíbrio está provavelmente sendo ocasionado por outros fatores, como cruzamentos entre indivíduos aparentados, efeito fundador, efeito gargalo ou amostragem (TAMBARUSSI et al., 2013; FORTI et al., 2014) não pela ligação dos locos. Por isso, foi considerado que os locos não estão ligados e puderam ser utilizados no estudo.

5.2. Diversidade genética, índice de fixação e diferenciação genética entre e dentro de populações

As populações de macaúba estudadas apresentaram níveis relativamente altos de polimorfismo. Nucci (2007) estudando *A. aculeata*, com oito marcadores SSR em 47 indivíduos divididos em oito populações, encontrou no máximo quatro alelos por loco ($\hat{A}$), enquanto no presente estudo foram até 19. Considerando todos os locos analisados, a população que teve mais alelos foi a GB com 67 alelos. Porém, é a população que possui mais alelos privados (11), seguida pela AM e FU (oito em cada). As duas populações (AM e GB) se encontram mais distantes (605 km), mostrando a influência do isolamento reprodutivo por distância (WRIGHT, 1946). Este fato também foi observado por Nucci (2007), no qual a maioria dos alelos privados se encontrava nas áreas que ficavam em locais fragmentados e possuíam potencial de endogamia. O número médio de alelos por loco encontrado no estudo foi maior que o encontrado em outros estudos de macaúba com marcadores SSR (2,18 e 4,4) (NUCCI et al., 2008; SILVA, 2013). Este resultado provavelmente está relacionado com a pequena amostragem realizada por estes autores (47 e 64 indivíduos, respectivamente). No presente estudo a amostragem foi de 200 indivíduos. Dessa forma, nos permitiu uma análise mais robusta. Observamos mais alelos raros nas populações (24 em AM e 20 em PJ). Apesar de alguns autores considerarem que apenas alelos com frequências maiores de 0,05 possuem importância adaptativa, os alelos raros também contribuem para diversidade genética em florestas e podem contribuir para adaptação em situações de estresse ou alterações bruscas do ambiente (KRUSCHE; GEBUREK, 1991; SEBBENN, 2006).

Em *Cocos nucifera* L. (coco da Bahia), utilizando 13 marcadores microssatélites para 195 indivíduos divididos em 10 populações, foram encontrados números menores de alelos (68 alelos) e de média de alelos por loco ($\hat{A}=5,2$) (RIBEIRO et al., 2010) do que a observada no presente estudo. Considerando outras espécies de palmeiras, o número de alelos por loco foi maior que o encontrado na macaúba, como em *Euterpe edulis* (palmito Juçara) variando de 8,5 a 11,5 (GAIOTTO et al., 2003) e em *Astrocaryum aculeatum* (Tucumã-do-amazonas) onde foram encontrados 101 alelos, com média de 10,1 alelos por loco (RAMOS, 2014).

Considerando os valores médios, os resultados deste estudo, tanto de $\hat{H}_o$, quanto de $\hat{H}_e$, foram maiores que os valores encontrados por Nucci (2007), estudando a mesma espécie com marcadores SSR em 9 populações distribuídas no estado de São Paulo e Minas Gerais: $\hat{H}_o = 0,268$ e $\hat{H}_e = 0,397$. Novamente, as discrepâncias nos

valores podem ser explicadas pelo pequeno tamanho amostral desse estudo, que foi de um total de 47 indivíduos divididos em nove populações. Os resultados foram maiores também aos valores encontrados por Silva (2013) onde a $\hat{H}_o$ e $\hat{H}_e$ foram de 0,180 e 0,473, respectivamente.

O $\hat{H}_e$ médio foi menor do que o encontrado em outra palmeira, *Enterpe edulis* (0,860) (GAOTTO et al., 2001), que utilizou 18 marcadores microssatélites e 144 indivíduos adultos, de 2 populações na região Centro-Oeste do Brasil. No estudo de *Astrocaryum aculeatum*, Ramos (2014), utilizando 14 marcadores microssatélites, 218 indivíduos divididos em 15 populações na região amazônica, as médias de $\hat{H}_e$ foram similares (0,594), enquanto as médias de $\hat{H}_o$ foram maiores que as encontradas na macaúba (0,639).

As populações AM e GB foram as que apresentaram as maiores diferenças entre as médias de $\hat{H}_e$ e $\hat{H}_o$ (0,157 e 0,107, respectivamente). A população GB foi a que teve os $\hat{H}_e$ maiores que os $\hat{H}_o$ em quase todos os locos, sugerindo o excesso de homozigotos nas populações. O resultado fica mais claro quando observa-se o índice de fixação positivo e significativo, no total, para as duas populações (AM e GB). A endogamia gera o excesso de homozigotos e isso pode levar a depressão endogâmica (FRANKAHAM, et al., 2008; TAMBARUSSI et al., 2016). Resultado semelhante foi encontrado em *Orbignyia phalerata* (Babaçu), utilizando oito marcadores microssatélites e 90 indivíduos adultos em três populações, no qual todas as populações tiveram $\hat{H}_e$ (de 0,67 a 0,79) maiores que $\hat{H}_o$ (de 0,43 a 0,57) (IBANES et al., 2015).

Os valores positivos e significativos do índice de fixação ($\hat{F}$) no total de três populações (PJ, GB e AM) também sugere desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, devido a excesso de homozigotos, e provavelmente esteja ocorrendo endogamia nestas populações (MOURA et al., 2009; TAMBARUSSI et al., 2016). Considerando que a espécie ocorre em maciços quase homogêneos e que provavelmente não há dispersores a longa distância (grandes animais), os prováveis polinizadores de voo curto acabam realizando polinização entre indivíduos aparentados, aumentando a endogamia da população. A única população que não apresentou valores significativos foi a população FU, apesar de alguns locos serem positivos, pode-se inferir que ela não possui excesso de homozigotos e não esteja sofrendo endogamia. Desta forma, FU destaca-se como uma população na região que esteja em condições de ser utilizada como uma área de coleta de sementes para produção de mudas na região. Já que sementes de áreas com endogamia devem ser evitadas, tanto para conservação, quanto para reflorestamentos, pois diminui o tamanho efetivo da população, possui altos níveis de mortalidade e crescimento reduzido (TAMBARUSSI et al., 2016).

O resultado é diferente do encontrado na palmeira “tucumã-do-Amazonas”, que possuiu todos os índices de fixação negativos o que indica excesso de heterozigotos (RAMOS, 2014) e segundo o autor está relacionado com o sistema de reprodução daquela palmeira, que é alógama. Apesar de a macaúba possuir as flores femininas e masculinas no mesmo cacho, e segundo Brito (2013) possuir protoginia e, por isso, é uma espécie preferencialmente alógama (SCARIOT et al., 1995), pode estar acontecendo cruzamento entre indivíduos aparentados nas populações PJ, GB e AM ($\hat{F}$ significativo).

A população com maior quantidade de alelos privados é a GB, que poderia indicar também o isolamento dessa população em relação às outras populações do Pontal (FU e PJ). Na população AM houve presença de sete alelos privados e a ausência de nove alelos que se encontram presentes nas outras três populações localizadas na região do Pontal do Paranapanema, indicando que não há fluxo gênico entre as populações encontradas no Pontal

do Paranapanema e a população de Amparo, o que, devido à distância, já era esperado. Porém, também há diferenças entre as populações mais próximas entre si, indicando que mesmo dentro de distâncias menores, de 13 a 30 km, o fluxo gênico também não ocorre. Isolamento por distância vem sendo observado por outros autores em diferentes espécies (TAMBARUSSI et al., 2015).

Foram encontrados, em populações do tucumã-do-Amazonas, 17 alelos privados em 13 populações (RAMOS, 2014). Dessa forma, pode-se considerar que a macaúba na região do Pontal do Paranapanema possui relativamente alta a quantidade de alelos privados e uma diversidade alélica similar a do tucumã na Amazônia. Considerando a possibilidade de coleta de sementes para conservação genética, poderia ser interessante fazer coleta em várias populações para se conseguir maior diversidade alélica, tanto para implantação de bancos de germoplasma quanto para plantios comerciais em sistemas agroflorestais. A diversidade encontrada também pode ser usada no melhoramento da espécie, que está sendo visada na produção do biodiesel, como também concluiu Machado (2016) ao estudar o manejo e conservação genética da espécie no Pontal do Paranapanema.

Considerando as estatísticas F , valores acima de zero para $\hat{F}_{IS}$ podem ser indicadores de excesso de homozigotos, e pode ser considerada a existência de endogamia (FRANKHAM et al., 2008; TAMBARUSSI, 2013). O $\hat{F}_{IS}$ encontrado foi acima de zero (0,1439), e portanto ocorre um certo grau de endogamia, assim como indicado pelo índice de fixação em três das quatro populações. Os valores de $\hat{F}_{ST}$ acima de 0,15 são considerados um indicativo de diferenciação entre populações e com baixas taxas de fluxo gênico entre as populações elas acabam se diferenciando (FRANKHAM et al., 2008). Como resultado de deriva genética e seleção natural as populações também se diferenciam com o tempo (HOLSINGER; WEIR, 2009). Desta forma, considera-se que as populações estudadas possuem alta diferenciação (16,8%). Considerando que as espécies com maiores taxas de cruzamentos, distribuição agregada e alta densidade populacional apresentam menor divergência entre populações (KAGEYAMA et al., 2003), a macaúba, por possuir tais características, deveria ter menor diferenciação populacional. Uma hipótese é que essa diferença é decorrente do baixo fluxo gênico entre as populações (MOURA et al., 2009; SILVA et al., 2011). Mesmo apresentando divergência relativamente alta, a maior parte da diversidade está concentrada dentro das populações (83,2%), seguindo o padrão observado em diversas espécies nativas nas quais a maior parte da diversidade ocorre dentro das populações e não entre as populações (KAGEYAMA et al., 2003; MORI et al., 2012).

Em outro trabalho com macaúba, as estatísticas F de Wright, utilizando quatro marcadores SSR, em 92 indivíduos divididos em 12 populações, foram: $\hat{F}_{IS}=0,482$; $\hat{F}_{ST}=0,1373$ e $\hat{F}_{IT}=0,5573$ (SHINCHARIOL et al., 2008). Os valores de $\hat{F}_{IS}$ e $\hat{F}_{IT}$ foram maiores do que os encontrados no presente estudo, porém pode estar relacionado com a amostragem utilizada. Segundo os autores, o valor de $\hat{F}_{ST}$, apesar de estar abaixo de 0,15, pode ser considerado um indicio de que as populações estão em um processo de diferenciação e que pode estar havendo um comprometimento da estrutura metapopulacional. Utilizando um análogo do $\hat{F}_{ST}$, o $\hat{\theta}_p$, na palmeira *Astrocaryum aculeatum* (tucumã-do-Amazonas), o valor de diferenciação foi baixo, desta forma, o mesmo padrão foi encontrado já que a diversidade estava mais concentrada dentro das populações do que entre as populações (96,5%) (RAMOS, 2014). Para *Enterpe edulis*, o $\hat{F}_{ST}$ foi 0,006, concluiu-se que existe pouca diferenciação entre populações e que deve haver um significativo fluxo gênico entre elas (GAIOTTO et al., 2003).

5.3. Estrutura genética espacial

Em espécies arbóreas, a estrutura genética espacial intrapopulacional (EGE) é causada por dispersão de sementes e pólen a curta distância, mais próximos da árvore mãe e pela sobreposição de gerações (SEBBEN, 2006; SEBBEN et al., 2011; SILVA et al., 2011). A polinização da macaúba é realizada principalmente por coleópteros e pelo vento, e secundariamente pelas abelhas, todos polinizadores de curta distância. A dispersão da macaúba é realizada por gravidade e por animais de grande porte, como a anta, capivara, ema e arara (POTT; POTT, 1994; SCARIOT et al., 1998).

Apenas para a população FU não houve EGE significativa (Figura 16 A). Este resultado indica que nesta população os polinizadores e os dispersores estão presentes e estão sendo eficientes para promover o fluxo gênico, causando a homogeneização e evitando a estruturação da população. Esta população pode ser considerada para se realizar coleta de sementes, pois provavelmente os indivíduos não serão aparentados, mesmo que estejam mais próximos. Também foi a população que não possuiu índice de fixação significativo ($\hat{F}$), corroborando a ausência de parentesco pela análise de estrutura genética espacial.

Para as populações PJ, GB e AM pode se observar estrutura genética significativa (Figura 16 B, C e D), sugerindo que as palmeiras que ocorrem dentro das distâncias significativas podem ser indivíduos aparentados. Para a população PJ, houve significância estatística na distância de 810 metros ($\hat{\theta}_{xy} = 0,0211$), porém, o valor alcançado não possui significado ecológico e a significância pode estar relacionada com a amostragem. Na população GB, a EGE foi de 38 metros ($\hat{\theta}_{xy} = 0,0182$ a $\hat{\theta}_{xy} = 0,0418$) próximo ao valor que indica primos de segundo grau ($\hat{\theta}_{xy} = 0,03125$). Na população AM, a EGE foi observada de até 71 metros ($\theta_{xy} = 0,0213$ a $\theta_{xy} = 0,0934$), com valores que abrangem primos de primeiro grau ($\hat{\theta}_{xy} = 0,0625$) (LINDGREN et al., 1997) e um valor que pode ser considerado próximo de meio irmãos ($\hat{\theta}_{xy} = 0,125$) (WEIR; COCKERHAM, 1984). Isto indica que nestas populações os indivíduos dentro destas classes de distância possuem algum nível de parentesco. Essas distâncias menores de EGE podem estar relacionadas com a ausência de dispersores de sementes de longa distância, fazendo com que os frutos se dispersem somente pela gravidade, então, indivíduos aparentados ficam mais próximos. Resultados semelhantes são encontrados em *Orbignya phalerata*, uma palmeira polinizada por coleópteros e pelo vento, e dispersa por barocoria e por roedores, na qual ocorre EGE de 40 a 60 metros ($\hat{\theta}_{xy} = 0,0217$ a $\hat{\theta}_{xy} = 0,0345$) (IBANES et al., 2015). Na população AM os coeficientes de coancestria também são maiores, chegando próximos aos índices de meios-irmãos, que pode ser explicado também, pelos níveis de endogamia e distanciamento desta população com as outras, indicados pelo índice de fixação ($\hat{F}$). Enquanto que a estruturação das populações GB e AM (de até 38 metros e até 71 metros, respectivamente) pode estar mais relacionada à presença de polinizadores de curta distância e ausência de animais dispersores de grande porte.

Os valores de coancestria encontrados, especialmente para as duas maiores populações estudadas (FU e PJ), são relativamente mais baixos que os valores de coancestria observados nas populações GB e AM. Segundo

Nucci et al. (2008) a estruturação genética da espécie estudada pode ser explicada pela antropização das regiões em que se encontram as populações estudadas, isso leva à redução da variabilidade genética e fluxo gênico entre as populações. As populações AM e GB se encontram em ambiente mais antropizado que as outras (FU e PJ). A população AM fica em uma área pequena (aproximadamente 4 ha) praticamente na zona urbana da cidade de Amparo. A população GB é um fragmento dentro de um dos maiores assentamentos do Pontal do Paranapanema, com cerca de 40 ha, enquanto as outras duas populações possuem cerca de 115 ha e 155 ha (FU e PJ, respectivamente).

Como a diversidade genética encontrada foi alta, acrescentando os dados de EGE, as populações estudadas podem ser utilizadas para se coletar materiais os mais diferentes possíveis, tanto para se instalar bancos de germoplasma, quanto para plantios comerciais em sistemas agroflorestais, priorizando as populações FU e PJ, e respeitando a distância de 38m e 71m para as populações GB e AM, respectivamente para evitar a coleta de indivíduos aparentados.

5.4. Sistema de Reprodução

O conhecimento do sistema de reprodução das espécies é muito importante para se programar coleta de sementes de polinização aberta por ser o sistema responsável pela transferência de informações genéticas (SEBBENN, 2002).

A $\hat{t}_m$ foi 0,97 (IC: 0,99-0,97) e a $\hat{t}_s$ foi 0,93 (IC: 0,93-0,95), os valores são altos e significativos compatíveis com os valores esperados para espécies alógamas ($\hat{t} > 0.8$), valor aceito na literatura segundo Goodwilli et al. (2005). O valor é correspondente com a síndrome de polinização, por besouros, e com a protoginia observada em espécies, que facilita a polinização cruzada (BRITO, 2013), porém contrária à afirmação de Scariot et al. (1991) e Brito (2013) de que a espécie possui sistema de reprodução mista. O valor de $\hat{t}_m - \hat{t}_s$ foi de 0,04 (IC: 0,02-0,04), esta diferença foi pequena, indicando que apesar da ocorrência de cruzamento entre indivíduos aparentados não ser comum na população, ela acontece. Segundo Scariot et al. (1991) e Brito (2013) a macaúba é autocompatível, e como apresentam altas taxas de cruzamento, indica que há polinização na área e que a protoginia está sendo um mecanismo eficiente para favorecer a fecundação cruzada.

O valor de $\hat{r}_{p(m)}$ foi 0,02 (IC: 0,00-0,01), ou seja, a probabilidade de dois indivíduos de cruzamento terem o mesmo pai é baixa e não significativa, portanto a população estudada não possui desvios dos cruzamentos aleatórios (RITLAND, 1989). O que pode ser observado pela alta porcentagem observada de meio-irmãos ($\hat{P}_{HS} = 92,67\%$) e baixas porcentagens de irmãos de autofecundação, irmãos completos e irmãos de autofecundação e cruzamento foi baixa ($\hat{P}_{SS} = 0,09\%$, $\hat{P}_{FS} = 1,41\%$ e $\hat{P}_{SHS} = 5,82\%$). O $\hat{N}_{ep} = 66,66$ não foi significativo, pois se encontra fora do intervalo de confiança (IC: 76,92-200), porém indica que houve grande quantidade de número de árvores doando pólen, e baixo índice de cruzamentos correlacionados.

A coancestria dentro de progênie ($\hat{\Theta}=0,134$) apresenta valor maior, porem próximo do valor esperado em populações panmíticas ($\hat{\Theta}=0,125$), indicando que há cruzamento entre indivíduos aparentados (MORAES, 2012), demonstrado também pelo parâmetro $\hat{t}_m - \hat{t}_s$.

Em macaúba, o único estudo genético do sistema reprodutivo existente foi realizado com 77 plântulas ao redor de 9 árvores mães, divididas em três populações (Amparo-AM: $n=53$; Ibiruna-IB: $n=13$ e Turvo-TR: $n=10$), onde foram encontrados os seguintes valores médios entre as populações estudadas: $\hat{t}_m=0,65$; $\hat{t}_s=0,44$; $\hat{t}_m - \hat{t}_s=0,21$ e $\hat{r}_{p(m)}=0,29$. Os autores chegaram à conclusão de que a espécie possui sistema misto de reprodução ($\hat{t}_m < 0,80$) apesar da possível presença de algum tipo de mecanismo de autoincompatibilidade que limite a autopolinização (ABREU et al., 2012). Pela taxa $\hat{t}_m - \hat{t}_s=0,21$, os autores concluíram que, apesar das taxas de fertilização cruzada serem altas, há cruzamento entre indivíduos aparentados e que a baixa taxa de correlação de paternidade significa que as progênies são compostas pela maioria de meio irmãos (ABREU et al., 2012).

Os resultados foram diferentes dos encontrados no presente estudo. Primeiramente, os próprios autores comentaram que a taxa de cruzamento estimada em plântulas já estabelecidas pode conter um viés, ao se comparar com as taxas reais, devido à depressão endogâmica que pode ocorrer entre as sementes e as plântulas estabelecidas (ABREU et al., 2012). Em segundo lugar, a $\hat{t}_m$ média apresentada é bem mais baixa que a $\hat{t}_m$ encontrada em IB e TR, duas das três populações, ($\hat{t}_m=1$), o que pode ser influenciada pela pequena amostragem total ($n=77$), que foi maior na população com menor taxa de cruzamento (AM: $n=57$, $\hat{t}_m=0,73$) e menor nas populações com $\hat{t}_m=1$ (IB: $n=13$ e TR: $n=10$).

Além disso, é sabido que apesar do sistema reprodutivo ser genético, ele é influenciado por fatores ambientais que podem afetar o comportamento das populações (SEBBENN, 2006). Como por exemplo, a antropização dos ambientes que está modificando o sistema de reprodução das espécies ao alterar as interações entre os polinizadores e as plantas, reduzindo a proporção de sementes por fecundação cruzada como resposta (ECKERT et al., 2010). Segundo Sebbenn (2006), a taxa de cruzamento entre plantas pode apresentar grande variação entre as populações, entre eventos reprodutivos da mesma população e, até mesmo entre flores na mesma árvore.

Uma consideração deve-se ao fato de que o cruzamento entre aparentados está associado com a estrutura genética espacial da população (RITLAND, JAIN, 1989; MORAES et al., 2004), e como a população escolhida para o estudo da macaúba no Pontal do Paranapanema (Fusquinha-FU) é uma população que nos estudos de diversidade genética não apresentou índice de fixação significativo e foi a única que não apresentou estrutura genética significativa, isso poderia explicar a pequena taxa de cruzamento entre aparentados. A população AM estudada por Abreu et al. (2012) é a mesma AM da Tabela 4 que apresentou índice de fixação significativo, o que também pode estar relacionado com a menor $\hat{t}_m$ encontrada por Abreu et al. (2012).

Em *Euterpe edulis*, outra espécie de palmeira, estudando duas populações na região central do Brasil, utilizando 18 locos microssatélites, os valores de $\hat{t}_m$ foram 0,9 e de 0,98; $\hat{t}_s=0,94$, nas duas populações; $\hat{t}_m - \hat{t}_s=0,4$ nas duas populações e $\hat{r}_{p(m)}$ foi de 0,71 e 0,73 (GAIOITTO et al., 2003). Valores semelhantes encontrados em Conte et al. (2008) para a mesma palmeira, indicando que a espécie é alógama e nos dois estudos possui cruzamento

entre aparentados e cruzamentos biparentais. Neste caso, os autores afirmam que a fenologia da espécie favorece o acontecimento de cruzamentos não aleatórios (GAJOTTO et al., 2003; CONTE et al., 2008).

Na espécie *Astrocaryum aculeatum* (tucumã-do-Amazonas) (RAMOS et al. 2011), analisando 240 progênies, os valores foram $\hat{t}_m = 0,978$, $\hat{t}_s = 0,978$ nas duas populações, $\hat{t}_m - \hat{t}_s = 0,001$, $\hat{r}_s = 0,898$, $\hat{r}_{p(m)} = 0,176$ e $\hat{N}_e = 3,74$. Demonstrando que a espécie estudada é alógama, com baixa taxa de cruzamento entre aparentados e baixa correlação entre os cruzamentos. Outra palmeira alógama é *Butia eriospatha* ($\hat{t}_m = 0,961$), com $\hat{t}_m - \hat{t}_s = 0,052$, baixa, porém apresenta certo cruzamento entre indivíduos aparentados e $\hat{r}_{p(m)} = 0,442$, um alto nível de correlação parental, demonstrando que os cruzamentos nesta palmeira não são aleatórios (NAZARENO; REIS, 2012).

No presente estudo o $\hat{N}_e = 3,1$ foi menor, porém próximo do que o valor máximo esperado em populações panmíticas ($\hat{N}_e = 4$) devido à existência de cruzamentos entre aparentados (SEBBENN, 2006). A partir do $\hat{N}_e$ estima-se o número de matrizes para coleta de sementes, tomando o número efetivo de referência ($N_{e(ref)} = 150$) para conservação a curto prazo (SEBBENN, 2006). Considerando que haverá a coleta de pelo menos 15 sementes por matriz, o número de matrizes para coleta de sementes no estudo foi de 49 ($\hat{m} = 48,29$). Ou seja, para se atingir o $N_{e(ref)} = 150$ há a necessidade de se coletar pelo menos 15 sementes de 49 árvores de macaúba.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espécie estudada possui alta diversidade genética na região do Pontal do Paranapanema, com parâmetros que condizem com outros estudos da espécie e com outras palmeiras. Apenas na população Fusquinha (FU) o índice de fixação não foi significativo.

A maior parte da diversidade se concentra dentro das populações, como para a maioria das espécies tropicais.

A macaúba é uma palmeira alógama, apresentando taxa de cruzamento ($\hat{t}_m$)=0,97. Apresenta também, baixo cruzamento entre indivíduos aparentados e não apresentou correlação de paternidade significativa.

No pontal do Paranapanema, a população Fusquinha (FU) poderia ser manejada e ser fonte de coleta de sementes, tanto pelo índice de fixação não significativo como pela não estruturação populacional.

A população Padre Josimo (PJ), apesar de apresentar índice de fixação significativo, não possui estruturação populacional, podendo ser utilizada para coleta de sementes também a fim de aumentar a diversidade genética das mudas.

As populações Gleba XV (GB) e Amparo (AM) possuem estruturação a curta distância e pode estar ocorrendo endogamia em ambas, portanto para a coleta de sementes deve-se respeitar as distâncias 38 e 71 metros, respectivamente, para produção de mudas com alta variabilidade genética.

Para coleta de sementes, a fim de atingir o $N_{e(ref)}=150$, há a necessidade de se coletar pelo menos 15 sementes de 49 árvores de macaúba.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. G.; PRIOLLI, R. H. G.; AZEVEDO-FILHO, J. A.; NUCCI, S. M.; ZUCCHI, M. I.; COELHO, R. M.; COLOMBO, C. A. The genetic structure and mating system of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 116-121, 2012.
- AMADOR, D. B.; VIANA, V. M. Sistemas agroflorestais para recuperação de fragmentos florestais. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 12, n.32, p. 105-110, 1998.
- APPLIED BIOSYSTEMS. **Genescan 3.7**. Foster City: Applied Biosystems, 2001. CD ROM.
- APPLIED BIOSYSTEMS. **Genotyper 2.0**. Foster City; Applied Biosystems, 1996. CD ROM.
- ASHBURNER, G. R.; FAURE, M.G.; JAMES, E. A.; THOMPSON, W.K.; HALLORAN, G. .M. Pollination and breeding system of a population of tal coconut palm *Cocos nucifera* L. (Arecaceae) on the Gazelle península of Papua New Guinea. **Pacific Conserv Biol.** v.6, p.344-351, 2001.
- BANDEIRA, F. S. **Cultivo in vitro e embriogênese somática de embriões zigóticos de macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges**. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Viçosa-UFV, Viçosa, 92p. 2008.
- BAWA, K. S.; BULLOCH, S. H.; PERRY, D. R.; COVILLE, R. E.; GRAYAUM, M. H. Reproduction biology of tropical lowland rain forest tree. II. Pollination system. **Am. J. Bota.**, v.72, p.346-356, 1985.
- BERTON, L. H. C. **Diversidade, estimativas de parâmetros genéticos e seleção de genótipos elite de macaúba (*Acrocomia aculeata*)**. Tese (Doutorado) Instituto Agrônômico de Campinas-IAC, Campinas, 139p. 2013.
- BHERING, L. **Macaúba: matéria-prima nativa com potencial para produção de biodiesel**. 2009. Disponível em <http://noticias.cnpae.embrapa.br/artigos-de-divulgacao/macaua-materia-prima-nativa-com-potencial-para-producao-de-biodiesel.pdf/download>. Acessado em 5 de maio de 2013.
- BRASIL. **Constituição Federal (1988)**. Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado Federal, 1988. 292p.
- BRASIL. **Lei 12.651, de 25 de maio de 2012**. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa; altera as Leis nºs 6.938, de 31 de agosto de 1981, 9.393, de 19 de dezembro de 1996, e 11.428, de 22 de dezembro de 2006; revoga as Leis nºs 4.771, de 15 de setembro de 1965, e 7.754, de 14 de abril de 1989, e a Medida Provisória nº 2.166-67, de 24 de agosto de 2001; e dá outras providências. Brasília-DF.2012. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/112651.htm.
- BRASIL, MMA. **A Convenção sobre Diversidade Biológica- CDB**, cópia do decreto Legislativo nº 2, de 5 de junho de 1992. MMA. Brasília, 2002, p.30.
- BRITO, A. C. **Biologia Reprodutiva de Macaúba: floração, polinizadores, frutificação e conservação de pólen**.Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa-UFV, Viçosa-MG,2013.
- BROSCHAT, T. K. Endocarp removal enhances *Butia capitata* (Mart.) Becc. (Pindo palm) seed germination. **Hort technology**, v. 8, p. 586-587, 1998.
- CARVALHO, K. J.; SOUZA, A. L.; MACHADO, C. C. **Ecologia, manejo, silvicultura e tecnologia da macaúba**. Convênio de cooperação técnica SECTES/FAPEMIG. Viçosa, 2011. Disponível em: http://www.ciflorestas.com.br/arquivos/d_b_b_15592.pdf Acessado em 30 de maio de 2013.
- CETEC. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais: Estudos das oleaginosas nativas de Minas Gerais**. Relatório Final do Convenio STI-MIC/CETEC, v. 1, 152 p. 1983.

- CLEMENT, C. R.; PÉREZ, L.; LEEUWEN, J. O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. **Agrociências**, Montevideu, v. 9, n. 1-2, p. 67-71, 2005.
- COCKERHAM, C. C. Variance of gene frequency. **Evolution**, Lancaster, v. 23, p. 72-84, 1969.
- CONTE, R.; MANTOVANI, A.; REIS, M. S.; VENKOVSKY, R. Genetic structure and mating system of *Euterpe edulis* Mart. Populations: a comparative analysis using microsatellite and alloenzyme markers. **J Hered.** v.99, p.476-482, 2008.
- DE MARCO J. R. P.; COELHO, F. M. Services performed by the ecosystem: Forest remnants influence agricultural cultures' pollination and production. **Biodiversity and Conservation**, v. 13, p. 1245-1255, 2004.
- DIAS, L. A. S.; KAGEYAMA, P. Y. Variação genética em espécies arbóreas e consequências para o melhoramento florestal. **Agrotrópica**. Ilhéus, v.3, n.3, p.119-127, 1991.
- DITT, E. H. **Fragmentos florestais no Pontal do Paranapanema**. São Paulo: Annableme / Ipê / IIEB, 2002. 140 p.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, p.13-15, 1990.
- ECKERT, C. G.; KALISZ, S.; GEBER, M. A.; SARGENT, R.; ELLE, E.; CHEPTOU, P. O.; GOODWILLIE, C.; JOHNSTON, M. O.; KELLY, J. K.; MOELLER, D. A.; PORCHER, E.; REE, R. H.; VALLEJO-MARIN, M.; WINN, A. A. Plant mating system in a changing world. **Trends in Ecology & Evolution**, v.25, n.1, p.35-43, 2010
- EISEN, J. A. Mechanistic basis of microsatellite instability. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLOTTERER, C. (Ed.) **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford: University Press, p. 34-48, 1999.
- ENGEL, V. L. **Introdução aos Sistemas Agroflorestais**. Botucatu: FEPAF, 1999.
- E-SIC, SISTEMA DE ACESSO A INFORMAÇÃO. https://esic.cgu.gov.br/sistema/site/primeiro_acesso.html, 2015.
- FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. Annual Review of Ecology, **Evolution and Systematics**, Palo Alto, v.34, p.487-515, 2003.
- FERNANDES, B. M.; RAMALHO, C. B. Luta pela terra e desenvolvimento rural no Pontal do Paranapanema (SP). **Estudos avançados** v.15, n.43, p. 239-254, 2001.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- FIRETTI, R.; FACHINI, C.; TURCO, P. H. N.; CAPANEMA, L. M.; VEIGA FILHO, A. A. Desenvolvimento regional do Pontal do Paranapanema: Percepção de futuro para a geração de empregos e renda. **SOBER Sociedade Brasileira de Economia e Administração e sociologia Rural**. Julho de 2010. Campo Grande-MS.
- FORTI, G.; TAMBARUSSI, E. V.; KAGEYAMA, P. Y.; MORENO, M. A.; FERRAZ, E. M.; IBANES, B.; MORI, G. M.; VENCOSKY, R.; SEBBENN, A. M. Low genetic diversity and intrapopulation spatial genetic structure of the Atlantic Forest tree, *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae). **Annals of Forest Research**, v. 57, n. 2, p. 165-174, 2014.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto, SP. SBG (Sociedade Brasileira de Genética), 2008. 280p.
- FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 631p.
- GAIOTTO, F. A.; GRATTAPAGLIA, D.; VENCOSKY, R. Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in Heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). **Journal of Heredity**, v.94, n.5, p.399-406, 2003.

- GAIOTTO, F. A.; GRATTAPLAGLIA, D.; VENCOSKY, R. Microsatellite markers of heart of palm- *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Arecaceae). **Molecular Ecology**, v.1, p 86-88, 2001.
- GARANT, D., FORDE, S. E., HENDRY, A. P. The multifarious effects of dispersal and gene flow on contemporary adaptation. **Functional Ecology**, London, n.21, p.434-443, 2007.
- GOODWILLI, C.; KALISZ, S.; ECKERT, C. G. The evolutionary enigma of mixed mating system in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. **Annu Rev ecol Syst.** v.36, p.47-79, 2005.
- GOUDET, J. (2001) **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3)**. Disponível em: <www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- GRATTAPAGLIA, D. COMUNICAÇÃO PESSOAL, email trocado com Eng. Flor.. pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Dr. Dário Grattapaglia. 2016.
- GRIBEL, R. Biologia reprodutiva de plantas amazônicas: importância para o uso, manejo e conservação dos recursos naturais. **Humanidades**, Brasília, n.48, p.110-114, 2001.
- HAMRICK, J. L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, Columbus, v.69, n.10, p.1685-1693, 1982.
- HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. SPAGeDI: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, Loughborough, v.2, p.618-620, 2002.
- HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. **Field guide to the palms of the Americas**. Princeton Princeton Univ Press. 1995. 352p.
- HIANE, P. A., RAMOS-FILHO, M. M. R., RAMOS, M. I. L., MACEDO, M. L. R. Óleo da polpa e amêndoa de bociúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Caracterização e composição em ácidos graxo. **Brazilian Journal of Food Technology** 8 256-259, 2005.
- HOLSINGER, K. E.; WEIR, B. S. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . **Nature Reviews Genetics**, v.10, p.639-650, 2009.
- IBANES, B.; SEBBENN, A. M.; AZEVEDO, V. C. R.; MORENO, M. A.; GANDARA, F.B.; TAMBARUSSI, E. V.; FERRZ, E. M.; DAMASCENO-SILVA, K. J.; LIMA, P. S. C.; CARVALHAES, M. A. Genetic diversity and spatial genetic structure in population of *Orbignya phalerata* Mart. under different exploitation intensities in the Brazilian savanna. **Silvae Genetica**, v.64, n.5-6, p.201-211, 2015.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Mapas de Biomas do Brasil, 2004. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/> . Acessado em 29 de setembro de 2014.
- INSTITUTO DE TERRAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. Pontal Verde: plano de recuperação ambiental nos assentamentos do Pontal do Paranapanema. **Cadernos ITESP**, São Paulo, n. 2, p. 1-75, 1998.
- KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B., OLIVEIRA, R. E. Biodiversidade e restauração da Floresta Tropical. In: Kageyama, P.Y.; Oliveira, R.E.; Moraes, L.F.D.; Engel, V.L.; Gandara, F.B. (Ed.) **Restauração Ecológica de Ecossistemas Naturais**. Botucatu: FEPAF, 2003. p 27-48.
- KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B.; SOUZA, L. M. I. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. Série Técnica IPEF. V.12, n.32, p 65-70, dez 1998.
- LEITE, J. F. **A ocupação do Pontal do Paranapanema**. São Paulo: Hucitec, 1999. 202p.
- LEMES, M. R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**, Oxford, v.12, p.2875-2883, 2003.
- LEVIN, D.A., KERSTER, H.W. Gene flow in seed plants. **Evolutionary biology**, New York, v.7, p.139-220, 1974.

- LI, Y. C.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, p.2453–2465, 2002.
- LIMA, E. S.; FELFILI, J. M.; MARIMON, B. S.; SCARIOT, A. Diversidade, estrutura e distribuição espacial de palmeiras em um cerrado *sensu stricto* no Brasil Central. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.26, n.3, p.361-370, 2003.
- LINDGREN, D.; GEA, L. D.; JEFFERSON, P. A. Status number for measuring genetic diversity. **Forest Genetics**, v.4, n.2, p.69-76, 1997.
- 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, n. 11, p. 1420-1425, 1995.
- LORENZI, G. M. A. C., **Acrocomia aculeata** (Jacq.) Lodd. ex Mart. – **Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável**. Curitiba, 2006, 156f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, Vol.1. Ed. Plantarum, Nova Odessa, SP.1992. 352 p.
- LORENZI, H. **Flora Brasileira: Arecaceae (palmeiras)**. Nova Odessa, SP: Plantarum, 2010.
- LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 15, p. 65-95, 1984.
- MARTINS, K. **Diversidade genética e fluxo gênico via pólen e sementes em populações naturais de *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) no sudeste de Goiás**. 2005. 128p. Tese- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2005.
- MAY, P. H.; TROVATTO, C. M. M. **Manual agroflorestal para a Mata Atlântica**. Brasília: Ministério do Desenvolvimento Agrário, Secretaria de Agricultura Familiar, 2008.
- MCGARIGAL, K.; CUSHMAN, S. A. Comparative evaluation of experimental approaches to the study of habitat fragmentation effects. **Ecological Applications**, Boulder, v.12, p.335-345, 2002.
- METZGER, J. P. Como restaurar a conectividade de paisagens fragmentadas? In: KAGEYAMA, P.Y. et al. (orgs.). **Restauração Ecológica de Ecossistemas Naturais**. Botucatu: FEPAF, 2003, 340 p.
- METZGER, J. P. O Código Florestal tem base científica? **Natureza & Conservação**, v.8, n.1, p.1-5, 2010.
- MIRISOLA FILHO, L. A. Cultivo e processamento do coco macaúba para produção de biodiesel. Viçosa: **Centro de produções técnicas**, 2009. 336p.
- MORAES, M. L. T.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Correlated mating in dioecious tropical tree species, **Forest Genetics**, v.11, n.4, p.55-59, 2004.
- MORAES, M. A. Uso de marcadores microsatélites para estimar parentescos dentro de progenies de polinização aberta de espécies arbóreas dióicas: um estudo de caso de *Myracrodruon urundeuva* (F.F. &M.F.Allemão). Dissertação (mestrado), UNESP-Ilha solteira, Ilha Solteira, 80 f., 2012.
- MORI, N. T.; MORAES, M. L. T.; MORITA, C. M.; MORI, E. S. Genetic diversity between and within populations of *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos using microsatellite markers. **Cerne**, v.18, n.1, 2012.
- MOTOIKE, S. Y.; LOPES, F. A.; OLIVEIRA, M. A. R.; CARVALHO, M.; SÁ JUNIOR, A. Q., 2007. **Processo de germinação e produção de sementes pré-germinadas de palmeiras do gênero *Acrocomia***. Protocolo INPI014070005335. Disponível em: <http://www.patentesonline.com.br/>
- MOURA, E. F. **Embriogênes somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica**. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Viçosa-UFV, Viçosa, MG, 2007, 66p.

- MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Scientia Agricola*, v. 67, p. 375-495, 2010.
- MOURA, T. M.; SEBBENN, A. M.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; OLIVEIRA, G. C. X.; KAGEYAMA, P.Y. Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanum* spp. Do Cerrado, estimadas por meio de locos microssatélites. *Scientia Forestalis*, v.37, n.82, p.143-150, 2009.
- MURCIA, C. Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. v. 10, n.2, p.58-62, 1995.
- NAIR, P. K. R. The coming of age of agroforestry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 87, p. 1613-1619, 2007.
- NAZARENO, A. G.; REIS, M. S. Linking phenology to mating system: exploring the reproductive biology of the threatened palm species *Butia eriospatha*. *Journal of Heredity*.v.70, 2012.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v.70, p.3321-3323, 1973.
- NEI, M. Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press, 1987. 512 p.
- NOVAES, R. F. **Contribuição para o estudo do coco macaúba**. Piracicaba, 1952. 85f. Tese- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- NUCCI, S. M. **Desenvolvimento, caracterização e análise da utilidade de marcadores microssatélites em genética de população de macaúba**. 2007. 84p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical)- Instituto Agronômico, Campinas, SP.
- NUCCI, S. M.; AZEVEDO-FILHO, J. A.; COLOMBO, C. A.; PRIOLLI, R. H. G.; COELHO, R. M.; MATA, T. L.; ZUCCHI, M. I. Development and characterization of microsatellites marks from the macaw. *Molecular Ecology Resources*, v. 8, p. 224-226, 2008.
- OLIVEIRA, J. E.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.
- PIMENTEL, L. D.; MOTOIKE, S. Y.; COSTA, E. W. A.; MANFIO, C. E.; BRUCKNER, C. H. **Estimativa de custo de produção e viabilidade econômica do cultivo da palmeira macaúba (*Acrocomia aculeata*) para produção de óleo vegetal**. Disponível em: <http://www.entabanbrasil.com.br/downloads/Estudo-de-Viabilidade-Economica-macaua-Leonardo-Pimentel.pdf> Acesso em 30 de maio de 2014.
- PINTO, L. R.; VIEIRA, L. M. C.; SOUZA, A. P.; SOUZA JÚNIOR, C. L. Isoenzimas e Microssatélites em Plantas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Uberlândia, v. 4, n. 20, p. 16-19, 2001.
- POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do pantanal**. Corumbá: Embrapa Pantanal.1994.320p.
- POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M. VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP, SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, Bélgica, v. 2, p. 225-238, 1996.
- RAMOS, S. L. F. **Estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais de tucumã-do-Amazonas por meio de microssatélites visando o manejo e conservação da espécie**. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba-SP, 120p., 2014.
- RAMOS, S. F. F.; LOPES, M. G. T.; CUNHA, R. N. V.; MACEDO, J. L. V.; 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 Breed Appl Biotech*, v.11, p.181-185, 2011.

- RAPOSO, A. **Estrutura genética e fluxo gênico de populações naturais de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) visando o manejo e a conservação da espécie.** 2007. 152p. Tese (Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- RIBEIRO, F. R.; BAUDOUIN, L.; LEBRUN, P.; CHAVES, L. J.; BRONDANI, C.; ZUCCHI, M. I.; VENKOVSKY, R. Population structures of Brazilian tal coconut (*Cocos nucifera* L.) by microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.33, n.4, p.696-702, 2010.
- RIBEIRO, L. M., SOUZA, P. P., RODRIGUES, J. R., OLIVEIRA, T. G. S., GARCIA, Q. S. Overcoming dormancy in macaw palm diaspores, a tropical species with potential for use as bio-fuel. **Seed Science and Technology**, v.39, p.303-312, 2011.
- RITLAND, K. Correlated-matings in the partial selfer, *Mimulus guttatus*. **Evolution** . v.43, p.848–859, 1989.
- RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. **Heredity**, v. 88, p.221-228, 2002.
- RITLAND, K.; JAIN, A. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. **Heredity**. v.47, p.35–52, 1981.
- RODRIGUES, E. R.; CULLEN J. R., L.; BELTRAME, T. P.; MOSCOGLIATO, A. V.; SILVA, I. C. Avaliação econômica de sistemas agroflorestais implantados para recuperação de reserva legal no Pontal do Paranapanema, São Paulo. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.31, n.5, p.941-948, 2007.
- RUSSELL, A.; SAMUEL, R.; RUPP, B.; BARFUSS, M. H. J.; SAFRAN, M.; BESENDORFER, V.; CHASE, M. W. Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachinae, Vandeae, Orchidaceae): Evidence from plastid DNA sequence data. **Taxon**, v.59, p.389-404, 2010. Modificado por INGLIS, P. ; GRATTAPAGLIA, D. Protocolo de extração de DNA de plantas- Lavagem com tampão de sorbitol e extração com 3x CTAB, Laboratório de genética vegetal. EMBRAPA-CENARGEM. Protocolo não publicado.
- SALA, O. E.; CHAPIN III, F. S.; ARMESTO, J. J.; BERLOW, E.; BLOOMFIELD, J.; DIRZO, R.; HUBERSANWALD, E.; HUENNEKE, L. F.; JACKSON, R. B.; KINZIG, A.; LEEMANS, R.; LODGE, D. M.; MOONEY, H. A.; OESTERHELD, M.; POFF, N. L.; SYKES, M. T.; WALKER, B. H.; WALKER, M.; WALL, D. H. Global biodiversity scenarios for the year 2100. **Science**, Washington, v.287, p.1770-1774, 2000.
- SAUNDERS, D. A.; HOBBS, R. J.; MARGULES, C. R. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. **Conservation Biology**, Arlington, v.5, p.18-32, 1991.
- SCARIOT, A. O. Seed dispersal and predation of the palm *Acrocomia aculeata* **Principes**, Brasília, v.42, n.1, p.5-8, 1998.
- SCARIOT, A. O.; LLERAS, E.; HAY, J. D. Flowering and fruiting phenologies of the palm *Acrocomia aculeata*: patterns and consequences. **Biotropica**, Washington, v.27, n. 2, p. 168-173, 1995.
- SCARIOT, A.O.; LLERAS, E.; HAY, J. D. Biology of the Palm *Acrocomia aculeata* in Central Brazil. **Biotropica**, v.23, n.1, p. 12-22, 1991.
- SCHROTH, G.; FONSECA, G. A. B.; HARVEY, C. A. The Role of Agroforestry in Biodiversity Conservation in Tropical Landscapes. In: SCHROTH, G.; FONSECA, G. DA; HARVEY, C. *et al.* (Eds.). **Agroforestry and Biodiversity Conservation in Tropical Landscapes**. Washington: Island Press, 2004. p. 1-12.
- SEBBENN, A. M. Sistema de Reprodução em espécies arbóreas tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamento ambientais. In: SILVA, L. D.; HIGA, A. R. **Pomar de sementes de espécies florestais nativas**. UFPR/FUPEF, 2006, 270p.

- SEBBENN, A. M. **Distribuição da variação genética de populações de jequitibá-rosa (*Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze) por caracteres quantitativos e isoenzimas.** 2001. 210p. Tese (Doutorado em genética e melhoramento de plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.
- SEBBENN, A. M. Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.14, p.115-132, 2002.
- SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO. 1999. Disponível em: http://www.ambiente.sp.gov.br/wp-content/uploads/noticias/bacia_inve2010.pdf. Acessado no dia 4 de junho de 2013.
- SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Cobertura vegetal nativa do Estado de São Paulo.** 2009. Disponível em: http://www.ambiente.sp.gov.br/wp-content/uploads/noticias/bacia_inve2010.pdf. Acessado no dia 4 de junho de 2013.
- SHINCHARIOL, L. P.; PRIOLLI, R. H. G.; COLOMBO, C. A. Caracterização da estrutura genética populacional em macaúba (*Acrocomia aculeata*) por meio de marcadores microsatélites. **Anais do 2º Congresso Interinstitucionais de Iniciação científica-CIIC**, Campinas, 2008.
- SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. Pollination and evolution in palms. **Phyton**, v.30, p.231-233, 1990.
- SILVA J. C.; BARRICHELO, L. E. G.; BRITO, J. O. Endocarpos de babaçu e macaúba comparados a madeira de *Eucalyptus grandis* para a produção de carvão vegetal. **IPEF**. 34 31-34, 1986.
- SILVA, J. C. **Macaúba: Fonte de matéria-prima para os setores alimentícios, energético e industrial.** Viçosa. 2007. Disponível em: <http://www.entabanbrasil.com.br>. Acessado em 5 de maio de 2013.
- SILVA, L. C. C. Estrutura genética e filogeografia molecular de populações naturais de acrotomia nos estados de minas gerais e São Paulo. 2013. Dissertação (Mestrado), Viçosa, MG.
- SILVA, L. C. C. S. **Estrutura genética e filogeografia molecular de populações naturais de *Acrocomia aculeata* nos estados de Minas Gerais e São Paulo.** Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Viçosa-UFV, Viçosa-MG, 40p. 2013.
- SILVA, M. S.; VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Diversity and genetic structure in natural populations of *Genoma schottiana* Mart (ARECACEAE): Implications for conservation. **Cerne**, v.17, n.2, p.195-2001, Lavras, 2011.
- SILVA, N. D.; JUNIOR, A. G. S.; PEREZ, R.; ÁVILA, M. B. R. **Avaliação da produção agrícola da macaúba.** 2008. www.bioenergiaufv.com.br/imagens/uploads/files/artigos/2008-avaliacao-da-producao-agricola-da-macauba.pdf (29 de junho de 2012)
- SISTEMA DE INFORMAÇÕES FLORESTAIS DO ESTADO DE SÃO PAULO- SIFESP. **Quantificação da vegetação natural remanescente para bacias hidrográficas do Estado de São Paulo-** Legenda IBGE-RADAM- 2009. Disponível em: http://www.iflorestal.sp.gov.br/sifesp/tabelas/bacia_inve2010.pdf Acesso: 28 de setembro de 2013.
- SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Austin, v.130, p.457-462, 1995.
- SODRÉ, L.B. Morfologia das palmeiras como meio de identificação e uso paisagístico. Monografia- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005. 62f.
- SOS MATA ATLÂNTICA, F.; INSTITUTO DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica.** Período 2013-2014. Estado de São Paulo, 2015. Disponível em:

http://mapas.sosma.org.br/site_media/download/atlas_2013-2014_relatorio_tecnico_2015.pdf (Acesso dia 02 de setembro de 2015)

- SPERA, M.R.N.; CUNHA, R.; TEIXEIRA, J.B. Quebra de dormência, viabilidade e conservação de sementes de buriti (*Mauritia flexuosa*). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 36, n.12, p.1567-1572, 2001.
- TABAI, S.A. Propagação da palmeira macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges através de métodos in vitro. 1992. 121f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo-USP. Piracicaba.
- TAMBARUSSI, E. V. **Contemporary gene flow, mating system, and spatial genetic structure in a *Jequitibá-rosa* (*Cariniana legalis* Mart. Kuntze) fragmented population by microsatellite markers**. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba-SP. 2013.
- TAMBARUSSI, E. V.; VENCOVSKY, R.; FREITAS, M. L. M.; SEBBENN, A. M. Mendelian inheritance, genetic linkage, and genotypic disequilibrium at nine microsatellite loci of *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze. **Genetics and molecular research**, v.12, n. 4, p.5442-5457. 2013.
- TAMBARUSSI, E. V.; BOSHIER, D.; VENCOVSKY, R.; FREITAS, M. L. M.; SEBBENN, A. M. Inbreeding depression from selfing and mating between relatives in the Neotropical tree *Cariniana legalis* Mart. Kuntze. **Conservation Genetics**. 2016.
- TAUTZ, D.; SCHLOTTERER, C. Simple sequences. **Current Opinion in Genetics & Development**, Oxford v. 4, n.6, p. 832-837, 1994.
- TEIXEIRA, L. C. Produção de biodiesel. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 79-86, 2005.
- TERRITÓRIOS DA CIDADANIA. Pontal do Paranapanema. Maio, 2013. Disponível em: <http://www.territoriosdacidadania.gov.br/dotlrn/clubs/territoriosrurais/xowiki/portlets/territorios/pages/folder-chunk>. Acessado em 15 de julho de 2014.
- TORRES, E.C.; SILVA JUNIOR, F. Pontal do Paranapanema: Um olhar por meio de trabalho de campo. **Geografia**, Londrina, v.19, n.1, 2010.
- TÓTH, G.; RENZ, M.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**. v.10, p.967-981, 2000.
- UEZU, A. Composição e estrutura da comunidade de aves na paisagem fragmentada do Pontal do Paranapanema. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, 193p, 2006.
- VALOIS, A.C.C; NASS, L.L.; DE GOES, M. Conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais. IN: NASS, L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARESINGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001.1183p.
- VARSHNEY, R.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n.1, p. 53-60. 2005.
- VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro, RJ. IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos ambientais, 1991. 124 p.
- VENCOVSKY, R. Análise de Variância de frequências alélicas. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 15, p. 53-60, Suplemento 1, 1992.
- VIANNA, S. A. **Caracterização da variabilidade fenotípica de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart. (Arecaceae): Etnobotânica, morfologia, produtividade e composição nutricional**. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Mato Grosso do Sul-UFMT. Corumbá-MT. 61p. 2011.

- VIVAN, J. L. **O papel dos sistemas agroflorestais para usos sustentáveis da terra e políticas públicas relacionadas** - Relatório Síntese e Estudos de Caso. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Subprograma Projetos Demonstrativos (PDA), 2010.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, p. 1358-1370. 1984.
- WRIGHT, S. Isolation by distance under diverse systems of mating. **Genetics**, v. 31, p. 39-59, 1946.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. **Evolution**, Lancaster, v. 19, p. 395-420, 1965.
- YEH, F. C.; BOYLE, T.; YANG, R. C.; YE, Z. H.; MAO, X. **Popgene**. University of Alberta: Edmonton, Canada, 1999.
- YOUNG, A., BOYLE, T., BROWN, T. The population genetics consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 11, n. 10, p. 413-418, 1996.
- YOUNG, C. E. F. Causas socioeconômicas do desmatamento na Mata Atlântica brasileira. In: GARLINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas. São Paulo. SOS Mata Atlântica. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2005. 472p.

ANEXO 1

Tabela – Locos analisados, alelos por loco e frequências alélicas de *Acrocomia aculeata* nas populações Fusquinha (FU), Padre Josimo (PJ), Gleba XV (GB) e Amparo (AM).

Loco	Alelos	FU	PJ	GB	AM
Aacu30	1	0,870	0,890	0,660	0,360
	2	0,000	0,000	0,070	0,240
	3	0,000	0,000	0,070 ^P	0,000
	4	0,060	0,030*	0,000	0,020
	5	0,000	0,000	0,010*	0,380
	6	0,020*	0,010*	0,050	0,000
	7	0,050	0,070	0,140	0,000
Aacu26	1	0,000	0,000	0,000	0,260 ^P
	2	0,400	0,540	0,290	0,000
	3	0,370	0,200	0,460	0,010*
	4	0,000	0,000	0,010* ^P	0,000
	5	0,210	0,150	0,210	0,250
	6	0,020*	0,100	0,020*	0,000
	7	0,000	0,010* ^P	0,000	0,000
	8	0,000	0,000	0,010*	0,030*
	9	0,000	0,000	0,000	0,450
Aacu07	1	0,000	0,031* ^P	0,000	0,000
	2	0,940	0,939	0,990	0,010*
	3	0,060	0,031*	0,010*	0,000
	4	0,000	0,000	0,000	0,990 ^P
Aacu12	1	0,000	0,000	0,010* ^P	0,000
	2	0,020*	0,160	0,112	0,010*
	3	0,000	0,000	0,000	0,020* ^P
	4	0,000	0,000	0,000	0,010* ^P
	5	0,031*	0,010*	0,020*	0,610
	6	0,031*	0,000	0,000	0,220
	7	0,480	0,390	0,296	0,130
	8	0,010*	0,020*	0,184	0,000
	9	0,051	0,060	0,020*	0,000
	10	0,000	0,000	0,010* ^P	0,000
	11	0,000	0,000	0,031* ^P	0,000
	12	0,245	0,260	0,235	0,000
	13	0,010* ^P	0,000	0,000	0,000
	14	0,020*	0,020*	0,000	0,000
	15	0,000	0,010* ^P	0,000	0,000
	16	0,020* ^P	0,000	0,000	0,000
	17	0,000	0,010* ^P	0,000	0,000
	18	0,082	0,060	0,071	0,000
	19	0,000	0,000	0,010* ^P	0,000

MAC245	1	0,000	0,000	0,000	0,010* _P
	2	0,000	0,000	0,010*	0,010*
	3	0,000	0,000	0,010*	0,010*
	4	0,000	0,000	0,000	0,010* _P
	5	0,120	0,030*	0,090	0,300
	6	0,000	0,010*	0,060	0,000
	7	0,010*	0,020*	0,050	0,100
	8	0,110	0,120	0,060	0,020*
	9	0,200	0,090	0,270	0,130
	10	0,320	0,280	0,000	0,070
	11	0,080	0,240	0,120	0,060
	12	0,000	0,000	0,020*	0,210
	13	0,000	0,000	0,010*	0,010*
	14	0,000	0,000	0,000	0,010* _P
	15	0,160	0,210	0,280	0,040*
	16	0,000	0,000	0,020* _P	0,000
	17	0,000	0,000	0,000	0,010* _P
MAC115	1	0,000	0,000	0,050	0,224
	2	0,000	0,000	0,050	0,010*
	3	0,000	0,090	0,010*	0,010*
	4	0,880	0,770	0,640	0,153
	5	0,020*	0,040*	0,000	0,010*
	6	0,000	0,000	0,060	0,296
	7	0,020*	0,010*	0,000	0,000
	8	0,000	0,060	0,160	0,276
	9	0,000	0,020* _P	0,000	0,000
	10	0,020*	0,000	0,010*	0,000
	11	0,060	0,010*	0,000	0,020*
	12	0,000	0,000	0,020* _P	0,000
MAC201	1	0,110	0,060	0,100	0,000
	2	0,440	0,650	0,530	0,120
	3	0,020*	0,040*	0,030*	0,010*
	4	0,410	0,190	0,320	0,870
	5	0,000	0,010*	0,020*	0,000
	6	0,000	0,010* _P	0,000	0,000
	7	0,000	0,040* _P	0,000	0,000
	8	0,020* _P	0,000	0,000	0,000
MAC240	1	0,000	0,000	0,010*	0,010*
	2	0,000	0,000	0,010* _P	0,000
	3	0,120	0,061	0,020*	0,010*
	4	0,000	0,000	0,010* _P	0,000
	5	0,010*	0,000	0,000	0,010*
	6	0,000	0,000	0,070	0,418
	7	0,000	0,010*	0,000	0,010*
	8	0,000	0,000	0,010*	0,041*
	9	0,090	0,020*	0,050	0,000

	10	0,130	0,061	0,090	0,020*
	11	0,000	0,000	0,010* ^p	0,000
	12	0,110	0,214	0,210	0,082
	13	0,050	0,010*	0,000	0,000
	14	0,250	0,296	0,370	0,316
	15	0,000	0,000	0,020*	0,041*
	16	0,010* ^p	0,000	0,000	0,000
	17	0,210	0,327	0,120	0,041*
	18	0,020* ^p	0,000	0,000	0,000
MAC23	1	0,010* ^p	0,000	0,000	0,000
	2	0,000	0,020*	0,000	0,010*
	3	0,020* ^p	0,000	0,000	0,000
	4	0,020*	0,020*	0,000	0,000
	5	0,320	0,400	0,400	0,460
	6	0,060	0,020*	0,080	0,020*
	7	0,250	0,240	0,330	0,440
	8	0,020* ^p	0,000	0,000	0,000
	9	0,300	0,300	0,190	0,070
TOTAL	103	56	58	67	59