

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E
SUSTENTABILIDADE NA AMAZÔNIA

The seal of the Universidade Federal do Amazonas is a circular emblem. It features a central figure of a bird, possibly a toucan, with its wings spread. The bird is surrounded by a laurel wreath. Above the bird are three stars. The text "UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS" is written in a circle around the top, and "IN UNIVERSA SCIENTIA VERITAS" is written around the bottom.

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM PROGÊNIES TIPO DURA
DE DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis* Jacq)**

CRYSTIANNE BENTES BARBOSA FERREIRA

MANAUS - AM
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E
SUSTENTABILIDADE NA AMAZÔNIA

CRYSTIANNE BENTES BARBOSA FERREIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM PROGÊNIES TIPO DURA
DE DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis* Jacq)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Sustentabilidade na Amazônia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agricultura e Sustentabilidade na Amazônia, área de concentração em Agroecologia.

Orientadora: Doutora Maria Teresa Gomes Lopes

Co-orientador: Doutor Djair Alves Moreira

MANAUS - AM

2009

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Ferreira, Crystianne Bentes Barbosa

F383D Diversidade genética em progênies tipo dura de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq) / Crystianne Bentes Barbosa Ferreira. - Manaus: UFAM, 2009.
60 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Agricultura e Sustentabilidade na Amazônia) — Universidade Federal do Amazonas, 2009.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Teresa Gomes Lopes

1. Dendê - Amazônia 2. Diversidade genética 3. Marcadores microssatélites I. Lopes, Maria Teresa Gomes II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 634.614:58.085(043.3)

CRYSTIANNE BENTES BARBOSA FERREIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM PROGÊNIES TIPO DURA
DE DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis* Jacq).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Sustentabilidade na Amazônia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agricultura e Sustentabilidade na Amazônia, área de concentração em Agroecologia.

Aprovada em 30 de Abril de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Djair Alves Moreira, Presidente
Universidade Federal do Pará

Prof. Dra. Doriane Picanço Rodrigues, Membro
Universidade Federal do Amazonas

Dr. Raimundo Nonato, Membro
Embrapa Amazônia Ocidental

AGRADECIMENTOS

À DEUS pela inspiração, inteligência e sabedoria.

À Prof.^a Dr.^a Maria Teresa Gomes Lopes, pela orientação, apoio e incentivo.

Ao meu marido pela compreensão em todos os momentos.

A minha família – pai, mãe, irmã e sobrinha.

A Embrapa Amazônia Ocidental por disponibilizar o material usado no trabalho e ao professor Ricardo Lopes pelo repasse das informações.

Ao Prof. Dr. Luis Antonio Serrão Contim, pelo treinamento e pela hospitalidade no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Nilton Lins durante os trabalhos de extração de DNA.

Ao meu co-orientador Dr. Djair Alves Moreiro pelo apoio, incentivo e correção da dissertação.

Aos meus colegas do curso e do Laboratório Biotecnologia da Universidade Nilton Lins – Santiago, Jorlana, Grace, Denise, Vanessa, Gilson.

As pesquisadoras Kyara Formiga de Aquino e Jacqueline da Silva Batista, pelo apoio nas genotipagens.

À Universidade Federal do Amazonas e ao programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical, incluindo os professores e funcionários, pelos conhecimentos adquiridos e pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelos recursos financeiros concedidos através da bolsa de estudos.

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

AGRADEÇO

RESUMO

O dendê (*Elaeis guineensis* Jacq) é uma palmeira de grande potencial para o desenvolvimento agrícola sustentável da região Amazônica, trazendo benefícios sociais, econômicos e ambientais. A disponibilidade de variedades com alta produtividade e melhores adaptadas às condições de cultivo tem papel fundamental na sustentabilidade do desenvolvimento dessa cultura. Para este fim o conhecimento da distribuição da diversidade genética entre e dentro das progênies de dendezeiro, por meio do uso de marcadores moleculares microssatélites fornecerá informações para a implementação de planos de uso e conservação dos recursos genéticos dessa espécie. O objetivo desse trabalho foi estimar parâmetros de diversidade genéticos entre e dentro progênies de dendezeiro utilizadas na produção de sementes comerciais da Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus-AM). Foram analisadas 24 progênies de dendezeiro que estão mantidas no Campo Experimental de Dendê do Rio Urubu (CERU) - Embrapa Amazônia Ocidental, sendo 22 progênies provenientes de autofecundação e duas de cruzamentos entre irmãos completos utilizando quatro *loci* SSR. Os dados obtidos foram analisados no Programa Genes e, através das análises verificou-se que existe baixa variabilidade genética nas progênies, com média de cinco alelos por *loci* e diversidade total (*HT*) igual a 0,0774. Dos quatro *loci* estudados o *loco* mEgCIR0254 apresentou fixado em todas as progênies e as progênies LM11592, LM11547, LM11732, LM12366, LM13533, LM12826, LM11591 e PO393612 apresentaram-se fixadas em todos os *loci*, devido principalmente serem progênies oriundas de autofecundação ou de irmão completos. As heterozigosidades observadas (*Ho*) no conjunto de plantas foram inferiores a heterozigosidade esperada (*He*) em todos os *loci*, sugerindo forte excesso de homozigotos, indicando existência de um processo endogâmico. Como o dendezeiro é planta alógama e as progênies serem geneticamente aparentadas, e ainda autofecundadas, é de se esperar que os efeitos da endogamia interfiram diretamente nos índices de heterozigose, contribuindo para a homogeneidade das progênies. A AMOVA detectou 62,99% do total da variação entre as progênies e 37,01% dentro das progênies. Ao contrário do que tem sido observado em plantas alógamas, seja em populações naturais ou coleções de germoplasmas, onde a maior variabilidade tem sido encontrada dentro das populações/procedências do que entre as

mesmas, neste trabalho observa-se que a maior parte da variação ficou retida entre as progênies, isso é de se esperar, pois 91,67% destas são oriundas de autofecundação.

Palavras-Chave: *Elaeis guineensis*, progênies, diversidade genética, marcadores microssatélites.

ABSTRACT

MOLECULAR GENETIC DIVERSITY OF PROGENIES TYPE OF DURA PALM (*Elaeis guineensis* JACD)

The palm (*Elaeis guineensis* Jacd) is a palm of great potential for sustainable agricultural development in the Amazon region, bringing social benefits, economic and environmental. The availability of varieties with high productivity and better adapted to the conditions of cultivation has a fundamental role in sustainable development of culture in this sense, one can resort to the use of biotechnology to increase the efficiency improvement programs. Microsatellite markers are tools preferred by breeders, because they are multi-allelic, has codominantes expression and show Mendelian inheritance, facilitating genetic analysis. Knowledge of the distribution of genetic variability within and between populations of palm, through the use of molecular markers, provide information for the implementation of plans for use and conservation of genetic resources of this species. From the results of that work can get grants for improving the palm at Embrapa Amazônia Ocidental, to provide the seed culture for the establishment of plantations with high productivity of oil. Samples were collected from 24 progenies of palm held at the Center for Experimental de palm the River Urubu (CERU) - Embrapa Amazônia Ocidental, and 22 progenies from self and two crosses between full siblings. There is low genetic variability in the progenies, with an average of five alleles per loci and total diversity (HT) equal to 0.0774. Of the four loci studied the site mEgCIR0254 had set in all the progenies and progenies LM11592, LM11547, LM11732, LM12366, LM13533, LM12826, LM11591 and PO393612, were fixed in all loci. These data were expected, they are progenies from self or full brother. The observed heterozygosities (Ho) the whole plant were lower than expected heterozygosity (He) in all loci, suggesting strong excess of homozygotes, indicating existence of a process endogamic. As the palm is allogamy plant and the progeny are genetically relatives, and autofecundadas, it is expected that the effects of inbreeding interfere directly in the indices of heterozygosity, contributing to the uniformity of the progenies. The AMOVA detected 62.99% of total variation among the progenies and 37.01% within progenies. Contrary to what has been observed in plants allogamy either in natural populations or collections of germplasm, where the greatest variability has

been found within populations / provenances than between them, this paper notes that most of the variation was retained among the progeny, that is to be expected, because 91.67% of these are from self.

Key-words: dendezeiro, progeny, genetic diversity, microsatellite markers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tipos de dendê em função da espessura do endocarpo.....19

Figura 2 - Origem da população Dura Deli do programa de melhoramento genético e produção de sementes da Embrapa Amazônia Ocidental - Manaus, 2000.....24

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Identificação dos genitores do tipo Dura utilizados na produção de das cultivares de dendezeiro do tipo tenera pela Embrapa Amazônia Ocidental (Campo Experimental do Rio Urubu, 2008).....32
- Tabela 2** - Reagentes e quantidades usados na PCR (Reação da polimerase em cadeia).....34
- Tabela 3** - Seqüência dos *primers* (*formard/reverse*) utilizados para os microssatélites de dendê (*Elaeis guineensis*) e seus respectivos tamanhos (pb) e temperatura de anelamento (°C) (Billote *et al.*, 2001).....35
- Tabela 4** - Heterozigosidade esperada H_e , heterozigosidade observada H_o e conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada *loco*.....37
- Tabela 5** - Frequências alélicas das 24 progênies – A1: alelo 1 e A2: alelo 2.....39
- Tabela 6** - Estimativas de parâmetros genéticos em 24 progênies de dendê, onde N: número de indivíduos amostrados; A: Número total de alelos; n_a : Número médio de alelos/*loco*; H_e : Heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg; H_o : Heterozigosidade observada; F: Coeficiente de endogamia e P: Percentagem de *Loci* polimórficos.....41
- Tabela 7** - Diversidade genética total (H_t), diversidade dentro das progênies (H_s), e diversidade entre as progênies.....45
- Tabela 8** – Análise de variância molecular obtida das 24 progênies de dendezeiro, utilizando 4 *loci* SSR.....47

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
1 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.1 Classificação do gênero <i>Elaeis</i>	16
1.2 Morfologia (Sistema radicular, Estipe, Sistema foliar, Cachos e frutos).....	16
1.3 Sistema reprodutivo.....	18
1.4 Tipos de dendê.....	19
1.5 Condições Ecológicas.....	20
1.5.1 Exigências edafoclimáticas.....	20
1.5.2 Temperatura do ar.....	20
1.5.3 Insolação e radiação solar	20
1.5.4 Chuva.....	20
1.5.5 Balanço hídrico.....	21
1.5.6 Solo.....	21
1.6 Uso e importância do dendezeiro.....	22
1.7 Conservação e uso de germoplasma de dendezeiro.....	23
1.8 Marcadores moleculares.....	26
1.8.1 Utilização de marcadores moleculares para o estudo de diversidade genética.....	27
1.8.2 Marcadores microssatélites.....	28
1.9 Diversidade genética em populações de plantas.....	28
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.1 Material vegetal.....	32
2.2 Extração do DNA.....	33
2.3 Quantificação e diluição do DNA.....	34

2.4 Amplificação dos <i>loci</i> microsátélites.....	34
2.5 Diluição e genotipagem dos <i>loci</i>	35
2.6 Análises estatísticas.....	36
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
3.1 Caracterização dos <i>loci</i> microssátélites.....	37
3.2 Caracterização das progênies.....	38
3.3 Distribuição da diversidade genética entre e dentro das progênies.....	45
3.3.1 Índice de fixação – Wright.....	45
3.3.2 Amova.....	46
4 CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

INTRODUÇÃO

A crescente preocupação mundial com a poluição ambiental, a busca de fontes renováveis de energia tornou-se uma meta global. Diante desse panorama, o governo brasileiro instituiu o “Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel”, sendo a cultura do dendezeiro a mais indicada como âncora desse Programa na região norte do país.

Sob o ponto de vista ecológico, social e econômico, a cultura do dendezeiro é uma das opções agrícolas recomendáveis para a região Amazônica, tendo em vista as suas características de cultivo perene, produção contínua ao longo do ano por mais de 25 anos e grande capacidade de absorção e fixação de mão-de-obra no campo, bem como a disponibilidade de terras que apresentam condições edafoclimáticas amplamente favoráveis (HARTLEY, 1988).

A disponibilidade de variedades com alta produtividade e melhores adaptadas às condições de cultivo tem papel fundamental na sustentabilidade do desenvolvimento da cultura, nesse sentido, pode-se recorrer ao uso da biotecnologia para aumentar a eficiência dos programas de melhoramento.

O conhecimento da distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações de dendezeiro, por meio do uso de marcadores moleculares, fornecerá informações para a implementação de planos de uso e conservação dos recursos genéticos dessa espécie.

Com o desenvolvimento de marcadores moleculares baseados em polimorfismo ao nível das seqüências de DNA, estes estudos ganharam uma poderosa ferramenta para caracterizar e avaliar recursos genéticos, especialmente para entender a estrutura e organização da diversidade genética das progênies e populações e seu monitoramento ao longo do tempo (FIGUEIRA; CASCARDO, 2001). Marcadores moleculares têm

sido usados no estudo da variabilidade genética de germoplasma selvagem e melhorado de dendê, dando suporte à preservação e ao melhoramento dos recursos genéticos disponíveis (PURBA *et al.*, 2000; BARCELOS *et al.*, 2002; HAYATI, 2004).

Dentre estes os marcadores microssatélites são ferramentas preferida pelos melhoristas, pois são multi-alélicos, tem expressão codominantes e exibem herança mendeliana (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998), facilitando a análise genética. Em plantas perenes, estes marcadores têm sido usados para avaliar o grau de heterozigosidade complementar em matrizes usadas para cruzamentos que buscam vigor híbrido (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Para avaliar variabilidade e heterozigosidade, os microssatélites são mais eficientes que os marcadores dominantes (RAPD, AFLP), pois possibilitam a distinção entre homozigotos e o heterozigoto.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estimar parâmetros de diversidade genética entre e dentro progênes de dendezeiro utilizadas na produção de sementes comerciais da Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus-AM) com quatro *loci* microssatélites., permitindo assim o conhecimento do nível de variação das progênes e da distância genética entre os indivíduos o que facilitará o direcionamento de novos trabalhos visando orientar a escolha de cruzamentos para a produção de sementes comerciais.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Classificação do gênero *Elaeis*

O dendezeiro pertence a família Arecaceae, anteriormente denominada Palmae, a qual sempre formou um distinto grupo de plantas entre as Monocotiledôneas. De acordo com Surre e Ziller (1969), Vallejo *et al.*, (1978) e Muller (1980) o gênero *Elaeis* possui três espécies, sendo a *Elaeis guineensis* Jacq mais importância economicamente; o caiaué *Elaeis oleifera* (H.B.K.) Cortez, que apesar de não ter importância econômica devido à baixa produtividade, tem sido utilizada pelos principais programas de melhoramento genético do dendezeiro devido a sua resistência ou tolerância a pragas e doenças, bem como, reduzido crescimento do tronco e óleo mais insaturado do que o dendê e; *E. odora*. As duas últimas espécies são encontradas no Brasil.

A espécie *Elaeis guineensis* também conhecida no Brasil como dendê, é originária do continente africano, provavelmente do Golfo da Guiné e encontra-se naturalmente dispersa desde o Senegal até Angola, sendo as populações mais densas encontradas na Costa do Marfim, Camarões e Zaire (SURRE & ZILLER, 1969; HARTLEY, 1983; VALLEJO *et al.* 1978; COTE D'IVOIRE, 1980; MULLER, 1980).

O cariótipo da espécie é conhecido, sendo seu genoma composto por 16 pares de cromossomos ($2n = 32$) e, como na maioria dos genomas de plantas, grande parte composto de seqüências repetitivas (MADON *et al.*, 1995). O tamanho do genoma foi estimado em $2C=3.76\pm 0.09$ pg (RIVAL *et al.*, 1997).

1.2 Morfologia (Sistema radicular, Estipe, Sistema foliar, Cachos e frutos)

O sistema radicular do dendezeiro é do tipo fasciculado, conhecido como “em cabeleira”. É formado a partir do bulbo radicular, que é um órgão de aproximadamente

80 cm de diâmetro, localizado na base do estipe (SURRE & ZILLER, 1969; VALLEJO *et al.* 1978).

As raízes primárias que saem do bulbo radicular são divididas em dois tipos: as verticais, que são as raízes de fixação, e as horizontais. Partindo perpendicularmente, das raízes primárias, nascem as raízes secundárias, que por sua vez, dão origem as raízes terciárias. Estas se estendem horizontalmente perto da superfície do solo, suportam as raízes quaternárias com comprimento de 10 mm e que constituem a principal zona de absorção de água e nutrientes (SURRE & ZILLER, 1969; VALLEJO *et al.* 1978; COTE D'IVOIRE, 1980; HARTLEY, 1983). A maior parte do sistema radicular do dendezeiro é superficial, com desenvolvimento favorecido pela presença de matéria orgânica em decomposição. A extensão das raízes depende da textura do solo, presença de camadas endurecidas ou lençol de água do solo.

O bulbo radicular, de onde saem as raízes do dendezeiro, é formado a partir de entrenós da base do estipe. Este bulbo, primeiramente se desenvolve no sentido transversal, para depois iniciar o alongamento dos entrenós ou crescimento longitudinal ou em altura, fazendo aparecer o estipe (VALLEJO *et al.* 1978; HARTLEY, 1983).

Em palmeiras jovens, o crescimento do estipe em altura é bastante lento, tornando-se depois constante. Este crescimento é resultante do desenvolvimento do ponto de vista vegetativo e bastante variável (30 a 100 cm por ano), dependendo da origem genética e das condições ambientais (COTE D'IVOIRE, 1980; MULLER, 1980).

Em condições normais de exploração, pode-se encontrar em um dendezeiro adulto uma coroa com 30 a 50 folhas irregularmente pinadas, medindo de 5 a 7 m de comprimento e pesando 5 a 8 kg cada uma (SURRE & ZILLER, 1969; VALLEJO *et al.* 1978; COTE D'IVOIRE, 1980; HARTLEY, 1983).

A folha é composta por um eixo central subdividido em parte basal, denominada de pecíolo, de aproximadamente 1,50 m de comprimento que se insere no estipe. O pecíolo apresenta uma seção grosseiramente triangular, portando sobre as duas arestas laterais uma centena de espinhos regularmente dispostos denominadas ráquis, que suporta os folíolos. Repartindo dos dois lados do ráquis, encontram-se de 250 a 350 folíolos com variável ângulo de inserção (SURRE & ZILLER, 1969).

A maturação do cacho do dendezeiro ocorre entre 5 a 6 meses após a fecundação das flores femininas da inflorescência. Nesta ocasião, o cacho de dendê tem uma forma ovóide e seu peso pode variar de 10 a 30 kg na idade adulta. O número de frutos por cacho pode chegar a 3000, mas o número médio situa-se por volta de 1500, representando 60 a 70% do peso do cacho. O fruto é uma drupa séssil de forma bastante variável. Mede de 2 a 5 cm de comprimento e pesa de 3 a 30 gramas (COTE D'IVOIRE, 1980; MULLER, 1980).

O fruto é uma drupa (fruto carnoso formado por um só carpelo contendo em seu interior apenas uma semente concrecida com o endocarpo duro) séssil de forma ovóide, com comprimento variando de 2 a 5 cm e pesando de 3 a 30 gramas (SURRE & ZILLER, 1969).

1.3 Sistema reprodutivo

O dendezeiro é uma planta monóica, as flores masculinas e femininas são produzidas na mesma planta, mas separadas, neste caso, em inflorescências masculinas e femininas. Estas são espádices compostas por espigas formadas nas axilas das folhas, protegidas por duas brácteas fibrosas (espatas). Cada esboço floral possui dois sexos, porém um deles fica rudimentar na axila de cada flor. Estas são emitidas em ciclos sucessivos e o período de maturidade sexual de uma inflorescência não se sobrepõe ao de outra, havendo, portanto, alogamia obrigatória. A duração dos ciclos depende da

origem genética das plantas, da idade, condições ecológicas e técnicas culturais (VIEGAS & MULLER, 2000).

1.4 Tipos de dendê

A classificação mais importante do dendê tanto do ponto de vista econômico como taxonômico, de acordo com Vanderweynen & Roels (1949) citado por Hartley (1983), diz respeito à espessura do endocarpo que pode ser observado na Figura 1.

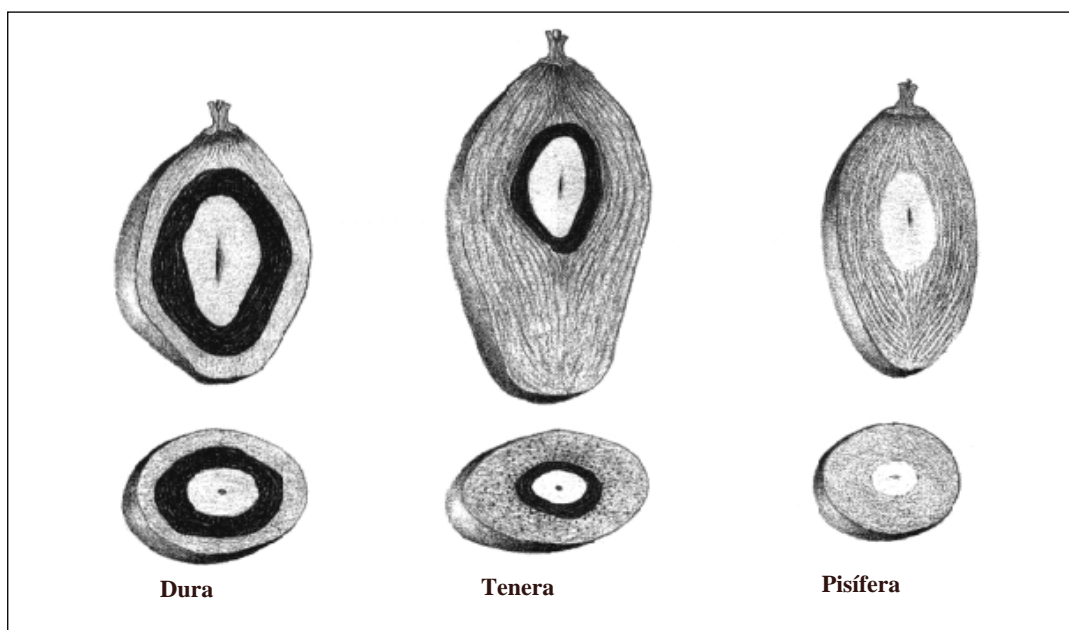


Figura 1 - Tipos de dendê em função da espessura do endocarpo. Fonte: Surre e Ziller (1969).

O tipo Dura apresenta frutos com endocarpo de espessura superior a 2 mm, podendo ser menos, 35-55 % de mesocarpo/fruto e não apresenta anel de fibra quando se observa o fruto após um corte transversal. A frequência deste tipo em palmeiras ou dendezais naturais é de 96%. Os frutos do tipo Tenera apresentam endocarpo com espessura inferior a 2 mm, 60-90 % de mesocarpo/fruto e anel de fibra presente no mesocarpo. Este tipo apresenta-se em palmeiras naturais com frequência próxima a 3% e o tipo Pisífera seus frutos não apresentam endocarpo e as flores femininas na maioria das vezes são estéreis e a frequência é inferior a 1%.

1.5 Condições ecológicas

1.5.1 Exigências edafoclimáticas

A cultura do dendezeiro é típica de regiões equatoriais quentes e úmidas, exigentes de temperatura do ar elevada e outros aspectos climáticos, tais como: pluviosidade, deficiência hídrica durante todo o ano, e horas de brilho solar são considerados de grande importância na produção do dendê (MORAES & BASTOS, 1972; BARCELOS *et al.* 1987; MULLER & ALVES, 1997; BASTOS *et al.* 1977).

1.5.2 Temperatura do ar

A temperatura do ar afeta a maioria dos processos físicos e químicos das plantas. No dendezeiro, considera-se que temperatura do ar entre 25° e 28°C de médias mínimas e 28° e 34°C de médias máximas, são mais favoráveis ao cultivo (MORAES & BASTOS, 1972; MULLER & ALVES, 1997).

1.5.3 Insolação e radiação solar

A insolação, como reflexo da radiação incidente, é considerada por Moraes & Bastos (1972) elemento climático de extrema importância na produção do dendezeiro, visto que insolação e radiação solar estão associadas à produtividade da cultura pelo processo da fotossíntese. A radiação solar influi na taxa de fotossíntese, na maturação dos cachos e na percentagem de óleo no fruto (DUFRENE, 1989).

1.5.4 Chuva

O dendezeiro é uma cultura exigente em boas condições de água no solo. O total anual e a distribuição das chuvas são de maior importância para a produção desta espécie.

Índice pluviométrico anual de 1.800 mm com chuvas bem distribuídas durante o ano, é considerado satisfatório para a cultura e que as variações pluviométricas anuais refletem na sexualidade das inflorescências e na produção dos cachos num intervalo de

até 28 meses e ainda que a pluviosidade afeta a emissão foliar, o número e o peso médio dos cachos (MORAES & BASTOS, 1972)

Baixas precipitações ou períodos superiores a dois meses sem chuva, afetam acentuadamente a emissão foliar, o número de cachos e o peso médio do cacho (HARTLEY, 1983).

1.5.5 Balanço hídrico

Segundo Moraes & Bastos (1972), características morfológicas do sistema radicular e da fenologia do dendezeiro estão intimamente associadas às suas exigências hídricas, tais como: sistema radicular superficial com boa parte constituída de raízes mortas que devido à natureza esponjosa, servem de reservatório de água no início da estação seca; folhagem nova e inflorescência associadas com boa disponibilidade de água no solo. De acordo com esses autores, locais com deficiência hídricas anuais abaixo de 100 mm são os mais indicados para a cultura.

1.5.6 Solo

Na Amazônia, o dendezeiro vem sendo cultivado principalmente nos Latossolos que são os mais representativos da região. São solos ácidos, com baixo nível de bases e, em geral, são álicos e deficientes em fósforo. Trabalhos conduzidos em Belém, no Estado do Pará (PACHECO *et al.*, 1985) e em Manaus, no Estado do Amazonas (RODRIGUES, 1993), demonstraram que o fósforo é o elemento mais limitante para o desenvolvimento e a produção do dendezeiro nesses Estados.

Com relação às características físicas, para um bom desenvolvimento, o dendezeiro necessita de solos profundos (não inferior a 1,5 m de profundidade) e não compactados, pois o sistema radicular fasciculado é sensível à compactação (OLIVIN, 1968; OLLAGNIER *et al.*, 1970; JACQUEMARD *et al.*, 1995). Embora o dendezeiro

apresente aptidão por solos argilosos, a principal limitação é a disponibilidade de água (JACQUEMARD, 1995).

Solos permeáveis, que garantam uma boa aeração e boa circulação da água no perfil é condição necessária para o bom desenvolvimento da espécie. Peralta *et al.*, (1985) concluíram que a manutenção das características físicas do solo pode contribuir de modo significativo para o aumento dos rendimentos pela melhor utilização dos adubos.

1.6 Uso e importância do dendezeiro

A Amazônia possui cerca de 70 milhões de hectares considerados como áreas aptas ou aproveitáveis para o cultivo do dendezeiro. Dessa área potencial somente 39 mil hectares são utilizados efetivamente com a cultura sendo que quase 85% dessa área cultivada estão localizadas no Estado do Pará. O Amazonas é o Estado que possui a maior área potencial para o plantio do dendezeiro - cerca de 50 milhões de hectares, correspondendo a 71,4%. Os demais Estados da Amazônia Ocidental como Acre, Amapá, Rondônia e Roraima têm, em conjunto, nove milhões de hectares, correspondendo a 12,9% do total de área potencialmente aproveitável (SUFRAMA, 2003).

O cultivo do dendezeiro pode ser considerado como uma atividade em condições de preservar o meio ambiente sem fortes agressões a floresta nativa porque pode ser plantado em áreas alteradas, possibilitando um perfeito recobrimento dessas áreas quando adulto e, na fase jovem, pode ser associado à leguminosas de cobertura de solo. Por isso, o dendezeiro pode ser enquadrado dentro do chamado desenvolvimento sustentável, sendo mais uma oportunidade de negócios na Amazônia (SUFRAMA, 2003).

É uma cultura permanente com produção contínua ao longo do ano, sem problemas de sazonalidade. Tem vida útil, do ponto de vista econômico, de 25 anos e é, dentre as oleaginosas cultivadas, a mais produtiva, com rendimentos superiores a 25-28 toneladas de cachos por ha/ano, com rendimento entre 4 a 6 toneladas de óleo por hectare correspondendo a 1,5 vezes a produtividade do óleo de coco, a 2 vezes a do óleo de oliva e mais do que 10 vezes a do óleo de soja (SUFRAMA, 2003).

Inúmeros são os usos e aplicações dos óleos de palma e de palmiste, tanto para alimentação humana e animal como para outros usos não comestíveis. Para alimentação humana, o óleo de palma é utilizado no preparo de margarina, gordura para panificação, biscoito, massas e tortas, pó para sorvete, óleo de cozinha, substitutos de manteiga de cacau, etc. Na alimentação animal, no preparo das rações balanceadas obtidas através de uma mesclagem com a torta de palmiste (coproduto resultante do processo de extração do óleo de palmiste) e do óleo de palma (integral ou sua fração líquida, a oleína) (KALINKA, 2002).

Para usos não alimentícios, os óleos são usados como insumos na fabricação de velas, cosméticos, crayons, detergentes, biodiesel, álcoois graxos, glicerina, condicionador de cabelos, folhas de flandres, tintas, lubrificantes, plastificantes, polidores, resinas, xampus, oleoquímico, chapas de aço, sabonete, sabões, etc. Segundo estudos, o óleo de dendê é rico nas vitaminas A e E, Tocoferol e Tocotrianol, poderosos antioxidantes, ajudando a combater os radicais livres do organismo e o colesterol, prevenindo a formação de trombos nos vasos sanguíneos e atuando como potente anticoagulante (KALINKA, 2002).

1.7 Conservação e uso de germoplasma de dendezeiro

Das origens de dendezeiro em avançado estágio de melhoramento genético e atualmente em uso pela Embrapa para a produção de sementes comerciais, destacam-se

a Deli, que predomina da produção mundial de sementes como genitor feminino (*Dura*) e a La Mé, uma das duas origens masculinas (*Pisifera*) mais utilizadas como fornecedoras de pólen na produção de sementes comerciais do mundo (BARCELOS *et al.*, 2001).

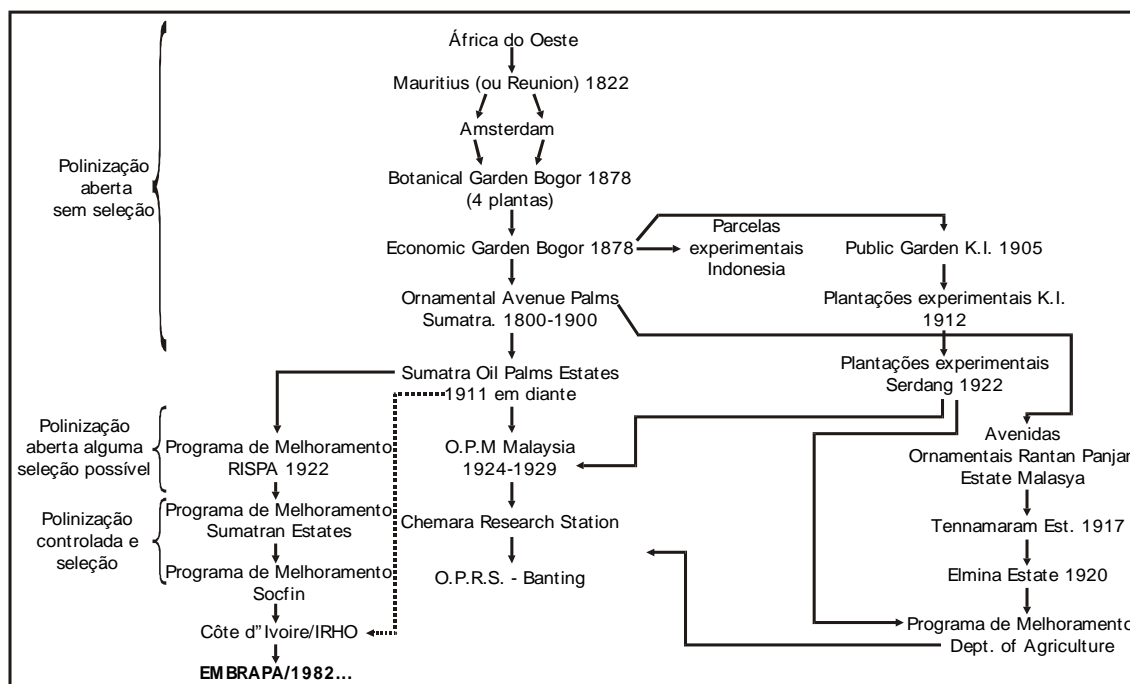


Figura 2 - Origem da população *Dura Deli* do programa de melhoramento genético e produção de sementes da Embrapa Amazônia Ocidental - Manaus, 2000.

A população Deli utilizada na produção de sementes comerciais de dendezeiro do tipo tenera é originada a partir de quatro palmeiras plantadas no Jardim Botânico do Bogor, Indonésia, em 1848, introduzidas via Amsterdã da ilha de Maurício ou da ilha de Reunião, não se sabendo ao certo. Como o dendezeiro não é nativo destas ilhas, a origem exata destas palmeiras é desconhecida (HARDON, 1976; ROSENQUIST, 1985 citados por BARCELOS *et al.*, 2001).

Devido ao número reduzido de plantas que deu origem à população *Dura Deli* a base genética é considerada estreita o que pode comprometer os avanços do programa de melhoramento genético e aumentar a vulnerabilidade das cultivares comerciais à

pragas e doenças. Atualmente são utilizadas na produção de sementes comerciais 21 linhagens do tipo Dura do segundo ciclo de seleção recorrente recíproca e não existe quantificação da variabilidade genética entre e dentro dessas linhagens. O termo linhagem em dendezeiro é empregado para distinguir as progênies pela sua ascendência, contudo, são progênies que passaram por um ou poucos ciclos de autofecundação e ainda apresentam parte de seus locos em heterozigose, situação típica de plantas alógamas e perenes (BARCELOS *et al.*, 2001).

A seleção recorrente recíproca, proposta por Comstock e Robinson (1948), visa à melhoria simultânea de duas populações. Estas populações devem ser geneticamente distantes e de elevado potencial agrônomico. Com a seleção recorrente recíproca, teoricamente, se tira vantagem tanto dos efeitos aditivos por meio da concentração dos alelos favoráveis em ambas as populações, bem como dos desvios de dominância, uma vez que se mantém a distância entre as populações permitindo explorar o fenômeno da heterose por meio do cruzamento entre as populações e/ou de linhagens oriundas das mesmas (SANTOS, 2003). Neste método os genótipos que apresentarem melhor capacidade de combinação com a população recíproca são recombinados entre si, assim pode-se avaliar tanto a capacidade geral quanto a capacidade específica de combinação, aumentando a resposta heterótica entre as duas populações (PINTO, 1995). Segundo Hallauer e Miranda Filho (1988), o sucesso da seleção recorrente recíproca depende da complexidade da característica sob seleção, da técnica experimental de avaliação das progênies e do efeito ambiente. Isso significa que pode ocorrer melhoria para a maioria das características, no entanto, algumas apresentam maior expectativa de ganhos do que outras.

As progênies Dura utilizadas na produção comercial de sementes de dendezeiro do tipo tenera pela Embrapa Amazônia Ocidental são oriundas do programa de

melhoramento genético do CIRAD (Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Developpement) da França, ex-IRHO. Este material foi introduzido na forma de autofecundações ou de cruzamentos entre irmãos de maneira a reproduzir cruzamentos que se destacaram em testes de progênies Dura x Tenera ou Dura x Pisífera. A seleção das plantas Dura submetidas a autofecundação ou cruzamentos entre irmãos foi realizada com base na sua capacidade de combinação nos testes de progênies e na avaliação *per se* (BARCELOS *et al.*, 2001).

1.8 Marcadores moleculares

Marcador molecular pode ser definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um determinado segmento específico de DNA que corresponde a uma região do genoma e que pode ser expressa ou não podendo ter também sua seqüência conhecida ou não. Por serem herdados geneticamente e possibilitarem a diferenciação genética de indivíduos os marcadores moleculares tem ampla aplicação em genética de populações e melhoramento genético (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Diversas técnicas de biologia molecular estão hoje disponíveis para detecção de variabilidade genética ao nível de seqüência de DNA para a detecção de polimorfismo genético. Estas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo. Tais marcadores podem ser utilizados para as mais diversas aplicações, tanto no estudo de genética como na prática de melhoramentos de plantas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os distintos tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade em nível de DNA, e assim variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (BOTSTEIN *et al.*, 1980) e minissatélites ou *loci* VNTR (Variable Number of Tandem Repeats); (JEFFREYS *et al.*, 1985). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (WILLIAMS *et al.*, 1990); SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions); STS (Sequence Tagged Sites) (PARAN & MICHELMORE, 1993); Microsatélite (LITT & LUTTY, 1989); e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (VOS *et al.*, 1995).

1.8.1 Utilização de marcadores moleculares para o estudo de diversidade genética

O emprego de técnicas moleculares na caracterização dos acessos, além de orientar o programa de melhoramento na escolha dos cruzamentos mais adequados, poderá proporcionar um grande avanço na racionalização da instalação de novas coleções, permitindo entre outros, a constituição de coleções nucleares, onde cerca de 80% da variação genética de uma coleção pode ser representada por 10% dos acessos (BROWN, 1989). Em se tratando de uma espécie como o dendê, a utilização dessa ferramenta em muito contribuirá para redução dos custos de manutenção das coleções vivas no campo. Grandes coleções internacionais, como o Banco de Germoplasma Internacional de Cacau, em Tridand, estão sendo caracterizadas com caracteres morfológicos, agronômicos, isoenzomáticos e moleculares, com o objetivo de identificar duplicações, erros de identificação, e selecionar materiais promissores para o programa de melhoramento (FIGUEIRA & CASDARDO, 2001).

Para determinação mais precisa e segura da variabilidade genética é necessária utilizar características não influenciáveis pelo ambiente. Neste sentido, as técnicas em

biologia molecular permitem a observação de polimorfismo diretamente na seqüência gênica dos organismos (ZUCCHI, 2002).

1.8.2 Marcadores Microsatélites

Dentre as técnicas disponíveis atualmente, os microsatélites SSR (*Simple Sequence Repeats* – Repetições de Seqüências Simples) tem sido muito utilizada em estudo de genética de populações de espécies silvestres devido à robustez, confiabilidade e praticidade operacional e por serem os marcadores mais informativos geneticamente (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

Microsatélites consistem em seqüências repetitivas em série em número variável encontradas nos genomas de plantas, adjacentes a seqüências de cópias únicas, apresentando um alto nível de polimorfismo, com alelos possuindo um número variável de repetições básicas (AKKAYA *et al.*, 1992; THOMAS & SCOTT, 1993; MORGANTE & OLIVIERI, 1993).

Tendo em vista a expressão co-dominante e o multialelismo, os marcadores SSR são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo na terminologia de marcadores moleculares. Por causa disso, toda e qualquer população segregante pode ser utilizada como população referência para estudos de ligação e mapeamento genético (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

1.9 Diversidade genética em populações de plantas

A diversidade genética é a porção hereditária de uma variação possível de ser observada e mensurada (HAMRICK, 1983). Segundo esses autores, quantifica o número de genótipos possíveis de ser detectado em uma população ou em qualquer hierarquia.

O grau de variabilidade genética e o padrão de sua distribuição entre e dentro de populações são influenciados pelo ambiente e pela localização geográfica. Quanto

maior a variabilidade genética numa população, maior a chance desta sobreviver às mudanças inesperadas no seu ambiente vital (KAGEYAMA, 1987).

Uma população é definida geneticamente pela soma das frequências de seus genes (ou seus alelos), uma medida que dá o grau de variabilidade ou heterozigose da população. Isto pode variar numa mesma espécie se ela formar populações em diferentes habitats (HAMRICK, 1983).

Estudos sobre diversidade genética são importantes em programas de melhoramento, por fornecerem parâmetros para identificação de genitores que, quando cruzados, possibilitam maior efeito heterótico na progênie e aumento na probabilidade de recuperar genótipos superiores nas gerações segregantes, além de permitirem o conhecimento da base genética da população (PANDEY & DOBHAL, 1997; FERRÃO *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2003).

As espécies tipicamente alógamas apresentam alta variação genética intrapopulacional em detrimento a variação genética interpopulacional que é menor, sendo que a divergência dentro de populações é inversamente proporcional à quantidade de fluxo gênico (quanto maior o fluxo menor a divergência intrapopulacional) (HAMRICK & LOVELESS, 1986).

A frequência de heterozigotos é considerada como um importante indicador da diversidade genética, uma vez que cada heterozigoto carrega alelos diferentes e, portanto, representa melhor a variação existente (WEIR, 1996). Nei (1973) propõe que a heterozigosidade esperada, ou diversidade gênica, seja uma medida mais apropriada por representar a variação tanto em populações de espécies autógamias como em alógamas. Além disso, o índice de fixação tem sido utilizado como uma medida de desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro de cada população.

Outro ponto importante refere-se a maneira pela qual a variabilidade genética é partida entre e dentro de populações, ou seja, o nível de heterogênea (não aleatória) dos alelos e genótipos no espaço e no tempo resultante de forças evolutivas, tais como mutação, migração, seleção e deriva genética que atuam dentro do contexto de cada espécie e população (HAMRICK, 1983).

A endogamia gerada por autofecundação ou o cruzamento entre aparentados também tenderá a alterar a frequência de certos alelos em relação ao total da população. Assim, tanto por endogamia, deriva genética ou seleção poderá ocorrer formação de grupos divergentes dentro das populações. No entanto, esta diferenciação pode ser contraposta pelo fluxo gênico, conforme discutido por Wright (1931), sendo que espécie com intenso movimento de pólen e sementes têm menor diferenciação do que espécies com fluxo gênico restrito (HAMRICK, 1989).

Desta forma, fatores como tamanho da população, modo de reprodução (assexual, sexual), sistema de reprodução (autofecundação, cruzamento, misto), fluxo gênico e tipos de ambientes em que a espécie ocorre influenciam na distribuição da variação genética entre e dentro de populações. Espera-se que espécies com grandes populações, sistema misto de reprodução, mecanismos eficientes de dispersão de sementes e pólen, apresentem alta variação genética dentro das populações e baixa entre. Já, para espécies com pequenas populações, de autofecundação e/ou reprodução vegetativa, com limitada dispersão de pólen e sementes, espera-se uma baixa variabilidade dentro e alta entre as populações (HAMRICK & SCHNABEL, 1985 e HAMRICK & LOVELESS, 1986).

A diversidade genética intrapopulacional tem sido quantificada em termos de número de alelos por loco (A), percentagem de *loci* polimórficos (P), heterozigosidade

observada (H_o) e esperada (H_e) sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, e índice de fixação (f) (HAMRICK, 1983 & ROBINSON, 1998).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Foram analisadas 24 progênes de dendezeiro do tipo Dura (Tabela 1), cada uma com 17 indivíduos. Essas progênes estão em estágio avançado de melhoramento genético e são utilizadas para a produção de sementes comerciais de dendê da Embrapa Amazônia Ocidental.

Tabela 1. Identificação dos genitores do tipo Dura utilizados na produção de das cultivares de dendezeiro do tipo Tenera pela Embrapa Amazônia Ocidental (Campo Experimental do Rio Urubu, 2008).

Progênie	Forma de obtenção da progênie	Genitores		Ascendência dos genitores
		Feminino	Masculino	
LM11490	Autofecundação	LM 3053 D	-	DA 5 D x DA 3 D
LM11076	Autofecundação	LM 3040 D	-	DA 5 D x DA 3 D
LM11592	Autofecundação	LM 3869 D	-	DA 5 D x DA 3 D
LM11672	Autofecundação	LM 3621 D	-	DA 5 D x DA 3 D
LM11547	Autofecundação	LM 3619 D	-	DA 5 D x DA 3 D
LM11574	Autofecundação	LM 3606 D	-	DA 5 D x DA 3 D
LM11732	Autofecundação	LM 3050 D	-	DA 5 D x DA 3 D
LM12236	Autofecundação	LM 3037 D	-	DA 5 D x DA 3 D
LM13533	Autofecundação	LM 3257 D	-	DA 5 D x DA 3 D
LM14376	Autofecundação	LM 3038 D	-	DA 5 D x DA 3 D
LM12213	Cruzamento entre irmãos	LM 3869 D	LM 3040 D	DA 5 D x DA 3 D
LM12119	Cruzamento entre irmãos	LM 3043 D	LM 3038 D	DA 5 D x DA 3 D
LM 11310	Autofecundação	LM 3604 D	-	DA 5 D X DA 3 D
LM12366	Autofecundação	LM 4976 D	-	DA 115 D x LM 269 D
LM12221	Autofecundação	LM 5215 D	-	DA 115 D x LM 269 D
LM12280	Autofecundação	LM 5100 D	-	DA 115 D x LM 269 D
LM12217	Autofecundação	LM 5229 D	-	DA 115 D x LM 269 D
DA 3991	Autofecundação	DA 115 D	-	DA 115 D x LM 269 D
LM 12509	Autofecundação	LM 4968 D	-	DA 115 D x LM 269 D
LM12826	Autofecundação	LM 5799 D	-	DA 8 D x DA 115 D
LM13246	Autofecundação	LM 2940 D	-	LM 404 D x DA 10 D
LM13375	Autofecundação	LM 3468 D	-	LM 404 D x DA 10 D
LM 11591	Autofecundação	LM 2935 D	-	LM 404 D x DA 10 D
PO3936	Autofecundação	PO 1994 D	-	LM 404 D x DA 3 D

Foram plantadas entre os anos de 1985 e 1987 utilizando o espaçamento de 9m x 9m x 9m em triângulo equilátero. Estão estabelecidas no Centro Experimental de Dendê do Rio Urubu (CERU) - Embrapa Amazônia Ocidental, o qual está localizado no

município de Rio Preto da Eva-AM a 150 km ao leste de Manaus/AM. O Centro possui aproximadamente 412 hectares produzindo sementes de alta qualidade, cuja produção anual é de 2 milhões de sementes.

Foram coletadas folhas jovens, acondicionando-as em sacos de polietileno, contendo sílica. Esta foi usada com o objetivo de reter a umidade da folha. O material coletado foi estocado em “freezer” com temperatura de -20 °C para melhor conservação.

2.2 Extração do DNA

Embora exista um número grande de protocolos na literatura para extração de DNA de plantas, a maioria dos trabalhos utiliza a metodologia baseada no protocolo de CTAB. A extração foi feita utilizando o método do CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio) descrito por Murray e Thompson (1980), com algumas modificações.

O tecido foliar foi macerado em cadinho com o CTAB e transferido para os microtubos pré-identificados, acrescentado 2µl de β-mercaptoetanol. Em seguida foi levado ao banho-maria a 65°C por 30 minutos. Foi acrescentado o CIA (Clorofórmio: álcool isoamílico) e centrifugado por 12 minutos a 15000 rpm. O CIA é um solvente orgânico que desnatura proteínas que ficam na interface, enquanto o DNA e outros contaminantes, como os carboidratos e RNAs, se mantêm na fase aquosa. Essa etapa pode ser chamada de desproteinização. Após essa etapa, o material extraído separou-se em duas fases, a superior ou aquosa (que contém os ácidos nucleicos) e a inferior ou orgânica (que contém proteínas, polissacarídeos ou pigmentos). Pipetou para novos tubos a fase aquosa e acrescentou 400 µl de Isopropanol. O material foi incubado por 12 horas (overnight) a -20 °C. O *pellet* foi lavado com Etanol 70% e 100% e ressuspendido com solução tampão de TE (Tris-HCl e EDTA) acrescido de RNase. O TE evita a degradação do DNA e a RNase permite a degradação das enzima de RNA.

2.3 Quantificação e diluição do DNA

A quantificação do DNA genômico foi realizada em gel de agarose 1 % (p/v) corado com Brometo de Etídio. Foi comparado o DNA com concentrações padrões conhecida do Fago lambda. O DNA padrão foi utilizado nas concentrações 50 e 100 ng. A corrida eletroforética foi realizada em cuba contendo tampão de corrida (10% TBE 10X e 90% de água destilada) a uma voltagem de 60 Volts por 20 minutos, e de 120 Volts por 20 minutos. Posteriormente o gel foi fotografado sob luz UV e quantificado. Depois de quantificado o DNA estoque, foi diluído a uma concentração de 10 ng de DNA/ μ l com água mili-Q.

2.4 Amplificação dos *loci* microsatélites

Amplificação se baseia na mistura da solução de trabalho contendo o DNA da amostra com uma mistura de soluções, que fornecem os reagentes necessários para a reação (MIX). A quantidade de elementos do MIX para cada amostra foi descrita na Tabela 2.

. **Tabela 2.** Reagentes e quantidades usados na Reação de PCR

Reagentes	Quantidades
H ₂ O mili-Q	9,8 μ l
Buffer Tp10X	2,0 μ l
dNTPs (2,5 mM)	1,0 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	0,9 μ l
<i>Primer</i> reverse (2,5 μ M)	0,5 μ l
<i>Primer</i> forward (2,5 μ M)	0,25 μ l
<i>Primer</i> fluorescente M13 (HEX ou FAM) (2,5 μ M)	0,25 μ l
Taq DNA polimerase (5 U/ μ l)	0,25 μ l
DNA (10 ng)	5,0 μ l

As amplificações dos PCRs foram executadas em um termociclador Mastercycler Gradient da Eppendorf. As PCRs foram desenvolvidas em duas etapas, conforme descrito por (RODRIGUES *et al.*, 2004). A primeira etapa consistiu na

desnaturação a 94°C por 1 min, seguida por 35 ciclos a 94°C por 30s. A temperatura de anelamento (T_a) do *primer* (Tabela 3) por 60s e finalmente a 72°C por 120s. A segunda etapa inicia-se por um ciclo de 72°C por 8 min, 30 ciclos a 94°C por 30s, logo a 50°C por 60s, depois a 72°C por 120s, e finaliza com uma extensão a 72°C por 10 min.

Os quatro *primers* (Tabela 3) escolhidos para a realização da amplificação já haviam sido pré-estabelecidos por Billotte *et al.*, (2001) para essa espécie.

Tabela 3 – Seqüência dos *primers* (*forward/reverse*) utilizados para os microssatélites de dendezeiro (*Elaeis guineensis*) e seus respectivos tamanhos (pb) e temperatura de anelamento (°C) (Billotte *et al.*, 2001).

Nome do Microssatélite	Número de Repetições	Seqüência 5' a 3' do <i>primer</i>	Amplitude Alélica (pb)	Temperatura de Anelamento (°C)
mEgCIR0008	(GA) ₁₈	CGGAAAGAGGGAAGATG ACCTTGATGATTGATGTGA	195-220	52
mEgCIR0219	(GA) ₁₇	TTTGCTCGGCGGATACAT CTCACTGGCCTCTTTCTT	135-187	52
mEgCIR0254	(GA) ₁₈	CCTTTTGIGCTTTCTTC GCTGTGCACTAGGTTTC	148-179	52
mEgCIR1772	(GT) ₂₂	ACCTTGATTAGTTTGTCCA CTTCCATTGTCTCATTATTCTCTTA	166-198	52

2.5 Diluição e genotipagem dos loci

Os produtos obtidos das PCRs foram diluídos em uma proporção de 10%, especificamente 5 µl do PCR foi diluído em 45 µl de H₂O mili-Q para ser utilizado na genotipagem. Os produtos gerados da PCR (diluídos) foram visualizados em seqüenciador automático (Mega Base 1000). A estimativa do tamanho dos alelos (pb - pares de bases) foi realizada com o programa Fragment Profiler (GE Healthcare, England), auxiliado pelo marcador de peso molecular (Size Standard) ET-400-ROX (GE Healthcare, England).

2.6. Análises estatísticas

Foram estimados os parâmetros que medem a diversidade genética, como o número total de alelos; número médio de alelos/loco; as heterozigosidades médias observada (H_o) e esperada (H_e); índice de fixação intrapopulacional ou coeficiente de endogamia (F_{is}) e percentagem de *loci* polimórficos. Foi calculado o conteúdo de informação do polimorfismo (PIC: polymorphic information content) para os quatros *loci* analisados tanto para as progênies de dendezeiro analisadas. Segundo Botstein *et al.*, (1980), os valores de PIC são classificados em três níveis: (a) altamente informativo ($PIC > 0,5$); (b) moderadamente informativo ($0,5 > PIC > 0,25$); (c) pouco informativo ($PIC < 0,25$).

A variância molecular entre e dentro das progênies foi realizada por meio de uma abordagem de AMOVA (Análise de Variância Molecular) (EXCOFFIER *et al.*, 1992). O teste de significância para a estimativa da AMOVA foi realizado com base em bootstrap, considerando 10.000 reamostragens. Todas as análises foram calculadas com aplicativo computacional GENES (CRUZ, 2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos *loci* microssatélites

Dentre os quatro pares de *primers* utilizados neste trabalho, de modo geral, apresentaram baixo grau de heterozigosidade média, tanto observada quanto esperada, com valores de 0,077 (7,7%) e 0,043 (4,3%), respectivamente (Tabela 4). A média do conteúdo de informações polimórficas (PIC) para os quatros *loci* é igual a 0,093 com valores indo de 0,042, no loco mEgCIR0254, a 0,167 no loco mEgCIR0219.

Tabela 4. Heterozigosidade esperada H_e , heterozigosidade observada H_o e conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada *loco*.

<i>LOCI</i>	He	Ho	PIC
mEgCIR0008	0,009	0,000	0,050
mEgCIR0219	0,219	0,172	0,167
mEgCIR0254	0,000	0,000	0,042
mEgCIR1772	0,081	0,000	0,070
Média	0,077	0,043	0,093

De acordo com Botstein *et al.*, (1980), um *loco* é considerado polimórfico quando $PIC \geq 0,1$ que corresponde, aproximadamente, à situação em que o alelo mais freqüente tem freqüência menor que 0,95, e altamente polimórfico quando $PIC \geq 0,7$. No caso específico deste trabalho, e considerando os critérios acima mencionados, apenas o *loco* mEgCIR0219 foi polimórfico.

Botstein *et al.*, (1980), consideraram que o PIC é uma informação importante para caracterizar a diversidade genética da população, e que o seu valor fornece estimativa do poder discriminatório do marcador, por considerar não somente o número de alelos por *loco*, mas também a freqüência relativa desses alelos. Consideraram ainda que, de maneira geral, os valores de PIC são inferiores aos obtidos para a

heterozigosidade, mas neste trabalho mesmo o marcador considerado polimórfico apresentou valor de PIC inferior aos de heterozigosidade.

O fato de a heterozigosidade ter sido baixa devido à endogamia presente nas progênies, somado a baixa riqueza de alelos, contribuiu para os baixos valores do PIC. Botstein *et al.*, (1980) consideram que existe uma relação direta entre o número de alelos e o PIC, ou seja, há uma tendência de que quanto maior o número de alelos maior será o valor de PIC.

Weir (1996) considera que o conteúdo de informações polimórficas representa a diversidade genética. Assim, o número de fragmentos com polimorfismo é diretamente proporcional ao número de *loci* em heterozigose.

Elevados números de polimorfismos foram detectados em germoplasma de outras palmeiras com o emprego de microssatélites. No caso de populações de coqueiro de diferentes variedade e origens geográficas Meerow *et al.*, (2003), Perera *et al.*, (2000) e Perera *et al.*, (2001) observaram alta diversidade alélica em estudos com oito *loci*.

3.2 Caracterização das progênies

As frequências alélicas obtidas nos quatro *loci* microssatélites empregados para o estudo das 24 progênies de dendezeiro estão apresentadas na Tabela 5. Analisando-se os dados observa-se que foram obtidos dois alelos por *loco*, totalizando oito alelos.

As progênies LM11592, LM11547, LM11732, LM12236, LM13533, LM12826, LM11591 e PO3936 apresentaram-se monomórficas em todos os *loci* estudados, podendo ser chamadas de fixadas para estes *locos*. O *loco* mEgCIR0254 foi monomórfico em todas as progênies analisadas.

Tabela 5. Freqüências alélicas das 24 progênies.

Progênies	<i>Loco</i>							
	mEgCIR0008		mEgCIR0219		mEgCIR0254		mEgCIR1772	
	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2
LM11490	0,00	1,00	0,79	0,21	1,00	0,00	1,00	0,00
LM11076	0,06	0,94	0,50	0,50	1,00	0,00	0,94	0,06
LM11592	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
LM11672	0,00	1,00	0,94	0,06	1,00	0,00	0,82	0,18
LM11547	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
LM11574	0,00	1,00	0,53	0,47	1,00	0,00	1,00	0,00
LM11732	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
LM12236	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
LM13533	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
LM14376	0,00	1,00	0,41	0,59	1,00	0,00	1,00	0,00
LM12213	0,00	1,00	0,65	0,35	1,00	0,00	1,00	0,00
LM12119	0,00	1,00	0,47	0,53	1,00	0,00	1,00	0,00
LM11310	0,00	1,00	0,38	0,62	1,00	0,00	0,94	0,06
LM12366	0,00	1,00	0,03	0,97	1,00	0,00	1,00	0,00
LM12221	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	0,12	0,88
LM12280	0,00	1,00	0,15	0,85	1,00	0,00	0,18	0,82
LM12217	0,00	1,00	0,56	0,44	1,00	0,00	0,24	0,76
DA 3991	0,00	1,00	0,50	0,50	1,00	0,00	0,18	0,82
LM12509	0,00	1,00	0,44	0,56	1,00	0,00	0,82	0,18
LM12826	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
LM13246	0,00	1,00	0,94	0,06	1,00	0,00	1,00	0,00
LM13375	0,06	0,94	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
LM11591	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
PO 3936	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00

Considerando-se um *loco*, quando um alelo é fixado, nenhum outro alelo está presente na população, e esta também é dita como fixada. Quando os *loci* de uma linhagem são fixados todos os indivíduos na população têm um genótipo idêntico com relação ao *loco* em questão.

Frankel *et al.*, (1996) considera que quando um alelo atinge a freqüência 1 ele é dito como fixado na população e quando atinge a freqüência 0, este foi perdido. As freqüências alélicas não variam além dos limites de 0 e 1, e cedo ou tarde, cada

linhagem deve atingir um ou outro destes limites. Uma vez a frequência alélica atinja 0 ou 1 ela não pode mudar mais naquela linhagem, a não ser na presença de mutação e migração.

Das 24 progênies estudadas 16 apresentaram polimorfismo, as menores frequências alélicas foram observadas na progênie LM12366 *loco* mEgCIR0219 com o valor de 0,03, seguindo das progênies LM11076 *loco* mEgCIR0008 e mEgCIR1772, LM11672 *loco* mEgCIR0219, LM11310 *loco* mEgCIR1772, LM13246 *loco* mEgCIR0219 e progênie LM13375 *loco* mEgCIR0008 apresentando o valor de 0,06. As baixas frequências alélicas nas progênies pode ser um indicativo de deriva genética que pode acarretar redução de variabilidade genética

Frankel *et al.*, (1996) consideram-se similares dois alelos que apresentam frequência entre 0,350 e 0,650. Analisando a similaridade entre as frequências alélicas das 16 progênies polimórficas, observa-se que as progênies LM11076, LM11574, LM14376, LM12213, LM11310, LM12217, DA 3991, LM12119 e LM12509 apresentaram equidade gênica entre os alelos somente no *loco* mEgCIR0219. Nos *loci* mEgCIR0008, mEgCIR0254 e mEgCIR1772 nenhuma progênie apresentou equidade gênica entre os alelos. A ausência de equidade gênica, segundo Frankel *et al.*, (1996), pode indicar menor diversidade nas populações e evidenciar maior suscetibilidade à fixação e perda de alelos quando tais populações são submetidas a perturbações e gargalos genéticos. Dessa maneira, como já era esperado nesse trabalho as progênies avaliadas estão sujeitas aos efeitos de deriva genética, apresentando alelos que podem ser perdidos.

As estimativas de parâmetros genéticos nas 24 progênies de dendezeiro estão apresentadas na Tabela 6. Com base na amplificação utilizando os quatro pares de *primers* de microssatélites as progênies apresentaram, em média um total de 5 alelos sendo que a

progênie LM 11076 foi a que apresentou o maior número com 7 alelos, resultando em 1,75 alelos por *loco*.

Tabela 6. Estimativas de parâmetros genéticos em 24 progênies de dendezeiro, onde N: número de indivíduos amostrados; A: Número total de alelos; n_a : Número médio de alelos/*loco*; H_e : Heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg; H_o : Heterozigosidade observada; F: Coeficiente de endogamia e P: Percentagem de *loci* polimórficos.

PROGÊNIES	N	A	n_a	H_e	H_o	F	P(%)
LM11490	17	5	1,25	0,0817	0,0735	0,1005	25
LM11076	17	7	1,75	0,1804	0,0735	0,5923	75
LM11592	17	4	1,00	0,0000	0,0000	1,0000	0
LM11672	17	6	1,50	0,1003	0,0000	1,0000	50
LM11547	17	4	1,00	0,0000	0,0000	1,0000	0
LM11574	17	5	1,25	0,1246	0,0882	0,0935	25
LM11732	17	4	1,00	0,0000	0,0000	1,0000	0
LM12236	17	4	1,00	0,0000	0,0000	1,0000	0
LM13533	17	4	1,00	0,0000	0,0000	1,0000	0
LM14376	17	5	1,25	0,1211	0,1471	-0,2143	25
LM12213	17	5	1,25	0,1142	0,1765	-0,5455	25
LM12119	17	5	1,25	0,1246	0,0588	0,5278	25
LM11310	17	6	1,50	0,1458	0,1324	0,0920	50
LM12366	17	5	1,25	0,0143	0,0147	-0,0303	0
LM12221	17	5	1,25	0,0519	0,0000	1,0000	25
LM12280	17	6	1,50	0,1354	0,0147	0,8914	50
LM12217	17	6	1,50	0,2132	0,0735	0,6552	50
DA 3991	17	6	1,50	0,1977	0,1324	0,3304	50
LM12509	17	6	1,50	0,1959	0,0441	0,7748	50
LM12826	17	4	1,00	0,0000	0,0000	1,0000	0
LM13246	17	5	1,25	0,0277	0,0000	1,0000	25
LM13375	17	5	1,25	0,0277	0,0000	1,0000	25
LM11591	17	4	1,00	0,0000	0,0000	1,0000	0
PO 3936	17	4	1,00	0,0000	0,0000	1,0000	0
Média	17	5	1,25	0,0774	0,0429	0,6362	24

As análises realizadas com os quatro *loci* SSR nas progênies de dendezeiro indicaram um baixo polimorfismo, sendo observado uma média de cinco alelos em cada progênie e 1,25 alelos por *loco*. Sendo populações avançadas de melhoramento é de se esperar que a seleção leve a fixação de muitos alelos, mesmo aqueles que não estão sob seleção.

Oliveira (2005) utilizando sete *primers* microssatélites em populações de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) encontrou no total 42 alelos, com variação de três a dez alelos, e em média seis alelos por *primer*.

Sawazaki *et al.*, (1998), avaliando 20 ecotipos de palmeiras, incluindo *E. oleracea* e *E. Espiritosantensis*, utilizando 24 *primers* RAPD, obtiveram basicamente 265 bandas, com 96% sendo polimórficas e altos níveis de polimorfismo, tanto intra como interespecífico. Já Costa *et al.* (2001), utilizando também 24 *primers* em dez genótipos de açazeiro, encontraram um número menor de produtos de amplificação (177) e baixa taxa de bandas polimórficas (43%).

Trabalho utilizando marcador do tipo RAPD, para avaliar a diversidade genética de 43 acessos de tâmara, uma palmeira dióica, Sedra *et al.* (1998) encontraram baixo nível de polimorfismo, produzindo apenas 56 bandas polimórficas e média de 2,9 bandas por *primer*. O mesmo fato foi registrado por Moretzsohn *et al.*, (2002), quando avaliaram a diversidade em 175 acessos de caiaué, palmeira monóica conhecida como dendê da Amazônia, que apresentaram de uma a oito bandas polimórficas, com média de 3 bandas por *primer*.

Germoplasma de outras plantas arbóreas tropicais demonstraram alto nível de polimorfismo com o uso do marcador RAPD, como clones de cacauero (FALEIRO *et al.*, 2001; MARQUES *et al.*, 2002; N' GORAN *et al.*, 1994), clones de seringueira (YAMADA *et al.*, 2002) e progênies de *Vitellaria paradoxa*, uma espécie da África (FONTAINE *et al.*, 2004).

De modo geral, pode-se aventar que há uma tendência de germoplasma de plantas arbóreas e alógamas, especialmente aquelas pouco melhoradas, apresentarem alto polimorfismo, exceção feita apenas ao caiaué. Assim sendo, o elevado polimorfismo detectado em 116 acessos de açazeiro pode estar relacionado ao fato

dessa espécie ser monóica, de fecundação cruzada e encontrar-se em fase de domesticação. Conseqüentemente, há possibilidades da ocorrência de ganhos genéticos significativos com o emprego desse germoplasma em programas de melhoramento (OLIVEIRA, 2005).

Pela avaliação dos quatro *loci* a percentagem de polimorfismo variou entre 25 a 75% em 15 progênes e não apresentou polimorfismo em nove progênes. A progênie LM11076 apresentou sete alelos, com média de 1,75 alelos por *loco*, assim como a maior taxa de polimorfismo, com 75%. Foram considerados como *loci* polimórficos apenas aqueles em que a freqüência dos alelos mais comum não excedia 95%, conforme Botstein *et al.*, (1980).

Nas progênes LM11672, LM11310, LM12280, LM12217, DA3991 e LM12509 foram observados seis alelos e a percentagem de polimorfismo foi de 50% de acordo com o critério estabelecido. As progênes LM11490, LM11574, LM14376, LM12213, LM12119, LM12221, LM13246 e LM13375 apresentaram 5 alelos cada uma totalizando 25% de polimorfismo. Em termos gerais as 24 progênes estudadas apresentaram níveis de riqueza alélica relativamente baixo devido serem progênes proveniente de autofecundação e cruzamento entre irmão como pode ser verificado na Tabela 1.

A heterozigosidade observada (H_o) é a proporção de indivíduos heterozigotos nas amostras da população, no conjunto das 24 progênes, variou de 0,1765 na progênie LM12213 para 0,0147 na progênie LM12280 com uma média de 0,0429, enquanto que a heterozigosidade esperada (H_e) é a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto num *loco* qualquer, e nesse trabalho ela foi mais elevada. O menor valor foi atribuído à progênie LM12366 (0,0143) enquanto a progênie LM12217 (0,2132) apresentou o maior resultado. A heterozigosidade média esperada foi de 0,0774. Em razão da

heterozigosidade média observada ter sido inferior a heterozigosidade esperada em todas as 24 progênies, ficou caracterizada a presença de excesso de homozigotos. O aumento de homozigotos indica a possível existência de um processo endogâmico.

Esta constatação pode ser confirmada observando-se a Tabela 1, onde as 24 progênies são obtidas por meio de autofecundação ou cruzamentos entre meio-irmãos completos, ambos de genitores aparentados como é o caso de 13 (ascendência DA 5 D x DA 3 A), 6 (ascendência DA 115 x LM 269 D) e 3 (ascendência LM 404 D x DA 10 D) progênies. Como o dendezeiro é planta alógama e as progênies serem geneticamente aparentadas, e ainda autofecundadas, é de se esperar que os efeitos da endogamia interfiram diretamente nos índices de heterozigose, contribuindo para a homogeneidade das progênies.

Como a heterozigosidade pode ser considerada uma medida de variabilidade genética, nota-se que as baixas percentagens de *loci* polimórficos, com média de 24%, são explicadas pela alta homozigose encontrada nas progênies. Menezes *et al.*, (2006), consideraram que esta medida se refere ao quanto da variação existe na população e como essa variação é distribuída através dos alelos em um *loco* que é analisado, e que a baixa heterozigosidade significa pouca variabilidade genética.

O índice de fixação médio, mostrado na tabela 6, das 24 progênies confirma em algumas progênies um nível alto de endogamia. O coeficiente médio de endogamia apresentado nas progênies foi de $F = 0,6362$, com variação de $-0,5455$ na LM 12213 a $0,8914$ na LM12280.

3.3 Distribuição da diversidade genética entre e dentro das progênes

3.3.1 Índice de fixação – Wright

A variabilidade genética total (Ht), pelo Índice de Fixação de acordo com Wright (1965), atingiu uma média de 0,179 (17,9%), mostrando uma baixa diversidade genética no material avaliado neste trabalho, diferentes dos resultados encontrados por Hernandez (2005) e Cole *et al.*, (2007) com três *loci* microssatélites, e por Couvreur *et al.*, (2006) com oito *loci* para populações de pupunheira cultivadas e silvestres. Altos índices de diversidade genética, diferenciando dos resultados encontrados neste trabalho, foram encontrados com outras palmeiras cultivadas, como *Cocos nucifera* (oito *loci* SSR; PERERA *et al.*, 2000), *Elaeis guineensis* e *E. oleifera* (21 *loci* SSR; BILLOTTE *et al.*, 2001).

A maior diversidade observada neste trabalho está concentrada **entre as progênes**, com um valor médio de 0,0788, considerando os quatro *loci* avaliados. Os valores da diversidade dentro das progênes variaram de 0,00 no *loco* mEgCIR0254 a 0,1713 no *loco* mEgCIR0219 com uma média de 0,0428, de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7. Diversidade genética total (Ht), diversidade dentro das progênes (Hs), e diversidade entre as progênes.

<i>LOCO</i>	Ht	Hs	Dst
mEgCIR0008	0,0097	0,00	0,0108
mEgCIR0219	0,4367	0,1713	0,2201
mEgCIR0254	0,0032	0,0000	0,0016
mEgCIR1772	0,2664	0,00	0,0828
Média	0,179	0,0428	0,0788

Furlan *et al.*,(2007) utilizando 20 *primers* microssatélite em população melhorada de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* mostraram que o maior valor de diversidade genética foi observado entre as progênes ($F_{ST} = 0,0901$). Esse resultado é extremamente interessante do ponto de vista produtivo, pois a partir dele espera-se obter

progênes homogêneas em relação às características de produtividade e qualidade. Ao mesmo tempo, espera-se uma diversidade entre as progênes, de forma que as melhores possam ser selecionadas para produtividade e qualidade do produto final e clonadas.

Yokomizo *et al.*, (2002) utilizando 31 progênes de meios-irmãos de pupunheira (*Bactris gasipaes* H.B.K.) com o objetivo de estimar alguns parâmetros genéticos constatou que o coeficiente de variação genética foi baixo pelo fato de as progênes terem sido selecionadas antes da instalação do experimento. As progênes foram obtidas de populações já melhoradas por instituições de pesquisa, reduzindo a variabilidade genética que existe comparativamente em populações naturais. Apesar deste fato, as progênes apresentaram variabilidade genética disponível para seleção. Estudos genéticos aprofundados devem ser realizados sobre as progênes disponíveis no campo experimental, pois a existência de variabilidade genética possibilita encontrar ao menos um indivíduo que poderá servir de base para cruzamentos futuros.

3.3.2 Análise da variância molecular - AMOVA

A análise de variância molecular revelou diferença significativa entre as progênes (0,2021, $P \leq 0,0001$), retendo 62,99% da variação total e, por conseguinte, alto nível de diferenciação genética (Tabela 8). Já a diversidade existente dentro das 24 progênes foi de 37,01% da variação total.

Resultados diferentes foram encontrados por Rodrigues (2006) utilizando oito *loci* microssatélites para avaliar a diversidade e a estrutura genética de progênes selecionadas de três populações de pupunheira da raça Pampa Hermosa onde detectou que 83,7% do total da variação genética foi encontrada dentro das progênes, 15% entre as progênes dentro das populações, e somente 1,2% entre as populações.

Tabela 8. Análise de variância molecular obtida das 24 progênies de dendezeiro, utilizando 4 *loci* SSR.

Fonte de variação	Variância	Variância %	Øst	P
Entre	0,2021	62,99	0,6299	0,0001
Dentro	0,1188	37,01		
Total	0,3209	100		

Ao contrário do que tem sido observado em plantas alógamas, seja em populações naturais ou coleções de germoplasmas, onde a maior variabilidade tem sido encontrada dentro das populações/procedências do que entre as mesmas, neste trabalho observa-se que a maior parte da variação ficou retida entre as progênies, isso é de se esperar, pois 91,67% destas são oriundas de autofecundação.

Níveis de diferenciação genética onde a maior parte da variação estava dentro das progênies, foram obtidos com o uso de SSR e de outros marcadores co-dominantes em germoplasma de dendezeiro (HAYATI *et al.*, 2004), em populações naturais de palmitero (*Euterpe edulis* Mart.) submetidas à ação antrópica (CONTE, 2008) e em procedências de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart) mantidas em coleção de germoplasma.

Utilizando 10 *loci* alozímicos e 8 SSR em 4 populações de palmitero, Conte (2008) atribuiu à alta diferenciação ao fato da espécie apresentar cruzamentos não aleatórios entre indivíduos aparentados (5%) e biparentais (10%), apesar dessa espécie se reproduzir por alogamia.

4. CONCLUSÕES

As progênies, no geral, apresentaram baixa diversidade. A maior parte da diversidade genética observada encontra-se entre as progênies, o que favorece nos cruzamentos o alcance da heterose.

Os marcadores SSR são eficazes na quantificação da diversidade genética dentro e entre as progênies de dendezeiro, pois os mesmos detectaram conteúdo de informações de polimorfismos.

O *loco* mEgCIR0254 apresentou-se monomórfico em todas as progênies analisadas sugerido que todos os indivíduos nas progênies têm um genótipo idêntico com relação ao *loco* em questão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKKAYA, M.S.; BRAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. **Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean.** Genetics, v. 132, p.1132-113, 1992.

BARCELOS, E.; AMBLARD, P.; BERTHAUD, J.; SEGUIN, M. **Genetic diversity and relationship in American and African oil palm as revealed by RFLP and AFLP molecular markers.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 37, n. 8, p. 1105-1114, 2002.

BARCELOS, E.; CUNHA, R.N.V.; NOUY, B. **Recursos genéticos de dendê (*Elaeis guineensis*, Jacq. e *Elaeis oleifera* (Kunth), Cortés) disponíveis na Embrapa e sua utilização.** In.: Müller, A.A. Agronegócio do Dendê: uma alternativa social, econômica e ambiental para o desenvolvimento sustentável da Amazônia. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001. p. 131-143.

BARCELOS, E.; PACHECO, A.R.; MULLER, A.A.; VIEGAS, I. de J.M.; TINÔCO, P.B. **Dendê: informações básicas para o cultivo.** Belém: EMBRAPA-UEPAE Belém/Brasília: EMBRAPA-DDT, 1987. 40p. (EMBRAPA-UEPAE Belém. Documentos, 1).

BASTOS, T.X.; SÁ, T.D.A.; PACHECO, N.A.; CORRÊA, M.M.; VIEGA, J.A.P.; RIBEIRO, W.M.N. **Variabilidade hídrica espacial e temporal na Amazônia e implicações para a cultura do dendê.** IN CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROMETEOROLOGIA, 10., 1997, Piracicaba. Agrometeorologia, monitoramento ambiental e agricultura sustentável: anais. Piracicaba: ESALQ/Sociedade Brasileira de Agrometeorologia, p.454-456, 1977.

BILLOTTE, N.; COUVREUR, T.; MARSEILLAC, N.; BROTTIER, P.; PERTHUIS, B.; VALLEJO, M.; NOYER, J.L.; JACQUEMOUD-COLLET, J.P.; RISTERUCCI, M.; PINTAUD, J.C. **A new set of microsatellite markers for the peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth), characterization and across-taxa utility within the tribe Cocoeae.** *Molecular Ecology Notes*, Oxford, v.4, p. 256-258, 2001.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICH, M. & DAVIS, R.W. **Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms.** *Am. J. Hum. Genetics.* 32:314-331, 1980.

BROWN, A. H. D. **Core collections: A practical approach to genetic resources management.** *Genome*,31, p. 818-24, 1989.

Carvalho L.P. de, Lanza M.A., Fallieri J. & Santos J.W. dos, **Análise da divergência genética entre acessos de banco ativo de germoplasma de algodão.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38:1149-1155, 2003.

COLE, D.M.; WHITE, T.L.; NAIR, P.K.R. **Maintaining genetic resources of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth): The role of seed migration and swidden-fallow management in northeastern Peru.** *Genetic Resources and Crop Evolution*, v.54, n.1, p.189-204, 2007.

COMSTOCK, R.E.; ROBINSON, H. F. **The components of genetic variance in populations of biparental progenies and their use in estimating the average degree of dominance.** *Biometrics.* 4:254-266, 1948.

CONTE, R.; SEDREZ, M. D.R, MANTOVANI, A.; VENCOVSKY. **Genetic Structure and Mating System of *Euterpe edulis* Mart. Populations: A Comparative Analysis Using Microsatellite and Allozyme Markers.** *Heredity* 2008:99(5):476–482.

COSTA, M.R.; OLIVEIRA, M. do S.P.; MOURA, E.F. **Variabilidade genética em açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.)**. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Brasília, v.21, p. 46-50, jul./ago. 2001.

COTE D'IVOIRE, Ministere de la Recherche Scientifique. **Le palmier a huile**. La Me : Ministere de la Recherche Scientifique/IRHO, 1980. v.1. 67p.

COUVREUR , T.L.P.; BILLOTTE, N.; RISTERUCCI, A.-M.; LARA, C.; VIGOUROUX, Y.; LUDENÑA, B.; PHAM, J.-L.; PINTAUD, J.-C. Close genetic proximity between cultivated and wild *Bactris gasipaes* revealed by microsatellite markers in Western Ecuador. **Genetic Research and Crop Evolution**, v.53, n.7, p. 1361-1373, 2006.

CRUZ, C. D. **Programa Genes - Diversidade Genética**. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2008. v. 1. 278 p.

DUFRENE, E. **Photosynthese, consommation en eau et modelisation de la production chez le palmier a huile (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. Orsay: Universite de Paris-Sud, 1989. 156p. These de Docteur.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. **Analisis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes:pplication to human mitochondrial DNA restriction data**. *Genetics*, v.131, p.479-491, 1992.

FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; YAMADA, M.M.; PIRES, J.L.; BAHIA, R.C.S.; SANTOS, R.C.; GOMES, L.M.C.; ARAÚJO, I.S.; FALEIRO, A.S.G.; GRAMACHO, K.P.; MELO, G.R.P.; MONTEIRO, W.R.; VALE, R.R. **Caracterização de variedades**

clonais de *Theobroma cacao* L com base em marcadores RAPD, AFLP e microssatélites. Agrotropica, Bahia, v.13, n.2, p. 79-86, 2001.

FERRÃO M.A.G., VIEIRA C., CRUZ C.D. & CARDOSO A.A. **Divergência genética em feijoeiro em condições de inverno tropical.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, 37:1089-1098, 2002.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética.** Brasília: EMBRAPA-CENARGEM. 3ª ed. 220p., 1998.

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 2. ed. Embrapa-Cenargem, Brasília, 1998.

FIGUEIRA, A.V.O.; CASCARDO, J.C.M. **Marcadores moleculares no melhoramento.** In: DIAS, L.A.S.(Ed.). Melhoramento genético do cacueiro. Viçosa: FUNAPE, UFG, 2001.p.385-438.

FONTAINE, C.; LOVETT, P.N.; SANOU, H.; MALEY, J. BOUVET, J.M. **Genetic diversity of the shea tree (*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn), detected by RAPD and chloroplast microsatellite markers.** Heredity, London, v.93, n. 6, p. 639-647, Dec. 2004.

FRANKEL, O. H.; BROWN, A. H. D.; BURDON, J. J. **The conservation of plant biodiversity.** Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 299p.

FURLAN, R.A.; MORI, E.S.; TAMBARUSSI, E.V.; MORAES, C.B.; JESUS, F.A.; ZIMBACK, L. **Estrutura genética de populações de melhoramento de *Pinus Caribaea* Var. *Hondurensis* por meio de marcadores microssatélites.** Bragantia, Campinas, v.66, n.4, p.553-563, 2007.

HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. 2^a ed. Ames. Iowa State University Press. 468 p. 1988.

HAMRICK, J.L. **Isozymes and analysis of genetic structure in plants populations**. In: Soltis, D.E.; SOLTIS, P.S. (Ed.). **Isozymes and analysis of genetic structure in plants populations**. London: Chapman and Hall, 1989. p.335-348.

HAMRICK, J.L. LOVELESS, M.D. **Isozyme variation in tropical trees procedures and preliminary results**. Biotropica, v.18, p.201-207, 1986.

HAMRICK, J.L. **The distribution of genetics variation within and among natural plant populations**. In: SCHONEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBRIDE, B.; THOMAS, L. (Ed.). **Genetics and conservation**. Menlo Park: The Bejamim/Cummings Publishing Company, 1983. p.335-348.

HAMRICK, J.L; SCHNABEL, A. **Understanding the genetic structure of plant populations: Some old problems and a new approach**. In: GREGORIOS, H.R. (Ed.). **Lecture notes in biomathematics: populations genetics in forestry**. Berlin: Springer Verlag, 1985. p.50-70.

HARTLEY, C.S.W. **La botanica de la palma de aceite**. In: Hartley, C.W.S. **La palma de aceite**. Mexico: Compania Editorial Continental, 806p., 1983.

HARTLEY, C.S.W. **The oil palm**. 3rd. ed. Tropical agriculture, Series. England. 1988. 761p.

HAYATI, A.; WICKNESWARI, R.; MAIZURA, I.; RAJANAIDU, N. **Genetic diversity of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) germplasm collections from Africa:**

implications for improvement and conservation of genetic resources. Theoretical And Applied Genetics, v.108, p.1274-1284, 2004.

HERNÁNDEZ, J.A. **Descripción de la diversidad y estructura genética de las poblaciones silvestres y cultivadas de pejibaye (*Bactris gasipaes* Kunth), y sus relaciones de parentesco, utilizando marcadores microsatélites.** 2005. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Costa Rica, San José.

JACQUEMARD, J.C. **Le palmier à huile.** Paris: Maisonnueve et Larose, 207 p., 1995. (Le Technicien d’Agriculture Tropicale, 33).

JEFFREYS, A.J.: WILSON, V. & THEIN, S.L. **Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA.** Nature, 316:76-79, 1985.

KAGEYAMA, P.Y. **Conservação *in situ* de recursos genéticos de plantas.** IPEF, v.35., p. 7-37, 1987.

KALINKA, Kelly, **Cultura de palma é nova promessa agrícola para a Amazônia.** Manaus: Amigos da Terra - Amazônia Brasileira, 2002. Disponível em: www.amazonia.org.br . Acesso em 18/07/2002.

LITT, M. & LUTY, J.A. **A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene.** Am. J. hum. Genetics. 44:398:401, 1989.

MADON M, CLYDE M.M, CHEAH SC. **Cytological analysis of *Elaeis guineensis* (tenera) chromosomes.** *Elaeis* 7: 122-134. 1995.

MARQUES, J.R.B.; FALEIRO, F.G.; ARAÚJO, I.S.; ANHERT, D. **Diversidade genética entre clones de seringueira das séries SIAL e Fx com base em marcadores RAPD.** *Agrotropica*, Bahia, v.14, n. 3, p. 159-164, 2002.

MEEROW, A.W.; WISSER, R.J.; BROWN, J.S.; KUHN, D.N.; SCHNELL, R.J.; BROCHAT, T.K. **Analysis of genetic diversity and population structure within Florida coconut (*cocos nucifera* L.) germoplasm using microsatellite DNA, with special emphasis on the Fiji Dwarf cultivar.** *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.106, n. 4, p. 715-726, Feb. 2003.

MENEZES, M.P.C.; MARTINEZ, A.M.; RIBEIRO, M.N.; PIMENTA FILHO, E.C.; DELGADO, J.V. **Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites.** *Revista Brasileira de Zootécnica*, Viçosa, v. 35, p.1336-1341, Jul. Ago 2006.

MORAES, V.H.F.; BASTOS, T.X. **Viabilidade e limitações climáticas para as culturas permanentes, semi permanentes e anuais com possibilidades de expansão na Amazônia brasileira.** In: INSTITUTO DE PESQUISA AGROPECUÁRIO DO NORTE (Belém, PA) IPEAN. *Zoneamento agrícola na Amazônia: 1ª aproximação.* Belém, 1972. p.123-153.

MORETZSOHN, M.C.; FERREIRA, M.A.; AMARAL, Z.P.S.; COELHO, P.J.A.; GRATTAPAGLIA, D.; FERREIRA, M.E. **Genetic diversity of Brazilian oil palm (*Elaeis oleifera* H.B.K.) germplasm collected in the Amazon Forest.** *Euphytica*, Wageningen, v.124, n. 1, p. 35-45, 2002.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M; **PCR-amplified microsattelites as markers in plant genetics.** *The Plant Journal*, v.3, p.175-182, 1993.

MULLER, A.A. **A cultura do dendê.** Belém: Embrapa-CPATU, 1980. 24p. (EMBRAPA-CPATU, Miscelânea, 5).

MULLER, A.A.; ALVES R.M. **A dendeicultura na Amazônia Brasileira.** Belém: EMBRAPA-CPATU. 1997.44p. (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 91.).

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

N'GORAN, J.A.K.; LAURENT, V.; RISTERUCCI, A.M.; LANAUD, C. **Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. using RFLP and RAPD markers.** Heredity, Oxford, v.73, n. 6, p. 589-597, Dec. 1994.

NEI, M. **Analysis of gene diversity in subdivided populations.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, v.70, n. 12, p.3321-3323, 1973.

OLIVEIRA, M.doS.P.de, **Caracterização molecular e morfo-agronômica de germoplasma de açaizeiro.** Ciência Agrotc. Lavras: UFLA, 2005. (Tese Doutorado)

OLIVIN, J. **Etude pour la localisation d'un bloc industriel de palmiers à huile (I).** Oléagineux, v.23, n.8/9, p. 499-504, 1968.

OLLAGNIER, M.; OCHIS, R. ; MARIN, G. **Adubação do dendezeiro no mundo** .Fertilité, v.36, n.2, p.3-64, 1970.

PACHECO, A.R.; TAILLIEZ, B.J.; VIÉGAS, I.J.M. **Resposta de N-P-K-Ca e Mg no desenvolvimento de mudas de dendê na região de Manaus-AM.** Belém: Embrapa-UEPAE de Belém, 1985. 17p.

PANDEY G. & DOBHAL V.K. **Multivariate analysis in taro (*Colocasia esculenta* L.)**. Indian Journal of Genetics & Plant breeding, 57:262-265, 1997.

PARAN, I. & MICHELMORE, R. **Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce**. Theor. Appl. Genet. 85:985-993, 1993.

PERALTA, F.; VÁSQUEZ, O.; RICHARDSON, D.L.; ALVARADO, A.; BORNEMISZA, E **Effect of some soil physical characteristics on yield growth and nutrition of the oil palm in Costa Rica**. Oleagineux, v.40, n.8/9, p.423-430, 1985.

PERERA, L.; RUSSELL, J.R.; PROVAN, J.; POWELL, W. **Levels and distribution of genetic diversity of coconut (*Cocos nucifera* L., var. *Typica form typica*) from Sri Lanka assessed by microsatellite markers**. Euphytica, Wageningen, v. 122, n. 2, p. 381-389, 2001.

PERERA, L.; RUSSELL, J.R.; PROVAN, J.; POWELL, W. **Use of microsatellite DNA markers to investigate the level of genetic diversity and 151 population genetic structure of coconut (*Cocos nucifera* L.)**. Genome, Ontario, v. 43, n. 1, p. 15-21, Feb. 2000.

PINTO, R.J. B. **Introdução ao melhoramento genético de plantas**. Maringá, 275p, 1995.

PURBA, A.R.; NOYER, J.L.; BAUDOUIN, L.; PERRIER, X.; HAMON, S.; LAGODA, P.J.L. **A new aspect of genetic diversity of Indonesian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) revealed by isoenzyme and AFLP markers and its consequences for breeding**. Theoretical And Applied Genetics, v.101, p.956-961, 2000.

RIVAL, A.; BEULE, T.; BARRE, P.; HAMON, S.; DUVAL, Y.; NOIROT, M. **Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) tissue cultures and seed-derived plants.** Plant Cell Reports (1997) 16: 884–887.

ROBINSON, I.P. **Aloenzimas na genética de populações de plantas.** In: ALFENAS, A.C. (Ed.). Eletroforese de Isoenzimas e Proteínas Afins: Fundamentos e Aplicações em Plantas e Microorganismos. Viçosa: UFV, 1998. p.329-380.

RODRIGUES, M.R.L. **Resposta do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) à aplicação de fertilizantes nas condições do médio Amazonas.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1993. 81p. (Tese M.Sc.).

RODRIGUES, D.P. **Diversidade genética e sistema de reprodução em progênies elites de pupunheira inerme (*Bactris gasipaes* Kunth) com marcadores microssatélites: implicações para o melhoramento do palmito.** Manaus: UFAM, 2006. Tese (Doutorado em Biotecnologia).

SANTOS, M. F., AGUIAR, A. M., FILHO, N. O. *et al.*, **Efeitos da seleção recorrente recíproca em um programa de melhoramento de milho.** Anais do 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. Porto Seguro, Bahia , 2003.

SAWAZAKI, H.E.; BOVI, M.L.A; SODEK, L; COLOMBO, C.A. **Diversidade genética em palmeiras através de isoenzimas e RAPD.** Revista Brasileira de Biologia, Rio de Janeiro, v.58, n.4, p. 681-691, 1998.

SEDRA, M. H.; LASHERMES, P.; TROUSLOT, P.; COMBES, M. C.; HAMON, S. **Identification and genetic diversity analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) varieties from Morocco using RAPD markers.** Euphytica, Wageningen, v. 103, n. 1, p. 75-82, 1998.

SUFRAMA. **Potencialidades regionais Estudo de viabilidade econômica Dendê.** Sumário Executivo. Manaus, 2003. In: <http://www.suframa.gov.br> (acessado em 14/08/2006).

SURRE, C.; ZILLER, R. **La palmera de aceite.** Barcelona: Ed. Blume, 1969. 243p.

THOMAS, M.R.; SCOTT, N.S. **Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites.** Theoretical and Applied Genetics, v. 86, p.985-990, 1993.

VALLEJO, G.; FIGUEREDO, P.; ROJAS, L.; MUNOZ, R.; MENA, E.; DE LA CRUZ, R.; GENTY, Ph.; SANCHEZ, A.; LOWE, J.; ARAGÓN, J. **Palma Africana de Aceite.** Palmeira: ICA – Centro Experimental Palmera 1978. 455p. (Manual de Assistência Técnica, 22).

VIÉGAS, I.J.M.; BOTELHO, S.M. **Nutrição e adubação do dendezeiro.** In: VIÉGAS, I.J.; MÜLLER, A.A. A cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira. Belém, Embrapa Amazônia Oriental/Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2000. p. 229-273.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. **AFLP: a new technique for DNA fingerprinting.** Nucleic Acids Research, v.23, n.21, p.4407-4414, 1995.

WEIR, B.S. **Genetic Data Analysis II: methods for discrete population genetic data.** Sunderland: Sinauer Associates, 1996. p.445.

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

WRIGHT, S. **Evolution in Mendelian population.** Genetics, v.16, p.97-159, 1931.

YAMADA, M.M.; FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; DANTAS NETO, A.; PIRES, J.L.; FLORES, A.B.; FALEIRO, A.S.G.; BAHIA, R.C.S. **Diversidade genética de acessos de cacauero da série CEPEC por meio de marcadores RAPD.** Agrotropica, Bahia, v.14, n.3, p. 137-140, 2002.

YOKOMIZO, G.; BIANCHETTI, A. **Genetic repeatability coefficient of characters in peach palm.** Revista Brasileira de Fruticultura, v. 24, n. 3, p. 731-733, 2002.

ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.P.V.; PINHEIRO, J.B.; BRONDANI, C.; VENCOVSKY, R. **Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. To *Eugenia dysenterica* (Mystaceae family).** Molecular Ecology Notes, v.3, n.4, Dec. 2002.