

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
TROPICAL**

The seal of the Universidade Federal do Amazonas is a circular emblem. It features a central figure of a hand holding a torch, surrounded by a laurel wreath. Above the hand are three stars. The text "UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS" is inscribed along the top inner edge of the circle, and "IN UNIVERSA SCIENTIA VERITAS" is inscribed along the bottom inner edge.

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS
● DE JAUARI (*Astrocaryum jauari* Mart.)**

LILIANE DOS SANTOS OLIVEIRA

MANAUS

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
TROPICAL**

LILIANE DOS SANTOS OLIVEIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS
DE JAUARI (*Astrocaryum jauari* Mart.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Agronomia Tropical área de concentração Produção Vegetal: Biotecnologia, genética e melhoramento.

Orientador: Prof. Dra. Maria Teresa Gomes Lopes

MANAUS

2012

LILIANE DOS SANTOS OLIVEIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES
NATURAIS DE JAUARI (*Astrocaryum jauari* Mart.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Agronomia Tropical área de concentração Produção Vegetal: Biotecnologia, genética e melhoramento.

Manaus, 01 de março de 2012

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. André Luiz Atroch, Membro
Embrapa Amazônia Ocidental

Prof. Dra. Luciana Souza de Aguiar e Souza, Membro
Universidade Federal do Amazonas

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força e determinação a mim concedida para que pudesse concluir este trabalho, além de ter colocado em meu caminho amigos fiéis.

À minha orientadora Dra. Maria Teresa Gomes Lopes, pelo apoio, incentivo e por ter acreditado que era possível com muito esforço, realizar este trabalho, além de proporcionar bons momentos de risadas na companhia de Vítor Lopes.

À Dra. Jânia Lilia da Silva Bentes por ter disponibilizado a estrutura do Laboratório de Microbiologia para as extrações de DNA e por ter dado a oportunidade de cursar disciplinas na Universidade Federal de Viçosa através no Programa de Cooperação Acadêmica PROCAD-UFAM/UFV.

À Liane Demosthenes pelos ensinamentos e apoio durante as extrações de DNA e pela sua grande amizade.

Ao Dr. Pedro Queiroz Costa Neto pelos grandes ensinamentos durante a caminhada. Ao amigo Pedro pela força e apoio nos momentos mais difíceis.

À Doutora Jacqueline da Silva Batista por disponibilizar a estrutura do Laboratório Temático de Biologia Molecular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA para as PCR's e genotipagem do material.

Aos colegas do Laboratório Temático de Biologia Molecular do INPA.

Ao amigo e grande profissional Santiago Linorio Ferreyra Ramos pela ajuda nas PCR's e genotipagem do material, sacrificando os seus domingos e horários de descanso para ajudar-me nesta fase.

Aos amigos que considero meus irmãos, Lucifrancy Vilagelim e Silfran Rogério, pelo carinho e respeito, por “adotar-me” inúmeras vezes nas horas do café, lanche e almoço, por levar-me para passear em companhia da minha sobrinha Izabelle, por me socorrer quando o

bendito pneu “inventou de pedir arrego”, além da ajuda pelo trabalho “braçal” que eu os submeti nas extrações de DNA.

Às minhas amigas do Clube das luluzinhas Raianny Mendonça, Adriana Uchôa e Marcileide Melo que transformavam os meus dias de solidão em momentos divertidos e de muita descontração, além do apoio durante a execução do trabalho.

À minha amiga, comadre e irmã Antonia Silva que sempre me ajudou a vencer todos os momentos difíceis em minha vida, que me incentivou a seguir em frente para que eu pudesse vencer, e por ter confiado a responsabilidade “agradabilíssima” de ser madrinha de seu lindo filho João Murilo.

À minha amiga Luziane Vítor por seu companheirismo, por muitas vezes ter cedido seu ombro para que eu pudesse chorar e desabafar e por ter feito uma das mais lindas declarações públicas de amizade que eu pude ver.

À minha amiga Erica Souza por sempre me fazer acreditar que era possível vencer e por me permitir ser sua amiga.

A Deiziane Almeida, Wanderléia Ribeiro, Jolemia Cristina, Iza Maria, Catiele Borges, Tainah Benlolo, Adriana Gil, Tatiana Sampaio, Jaisson Oka, Gilson Sánchez, Januário Macedo e demais colegas de pós-graduação pelo apoio, confiança e paciência quando precisei descontrair, e ter bons “papos cabeça” me ajudando desenvolver essa pesquisa.

À Universidade Federal do Amazonas, e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia Tropical pela oportunidade de realização deste trabalho, que por meio de seus docentes e funcionários me permitiram crescer profissionalmente.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

AGRADEÇO

Aos meus pais, Raimunda e José, por me ensinar o caminho da retidão, e aos meus sobrinhos Luís Guilherme e Isabela que tiveram que conviver em muitos momentos com minha ausência.

DEDICO

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - *Astrocaryum jauari* Mart. em ambiente natural e frutos da espécie.....15
- Figura 2** – Imagem de satélite da localização das comunidades em que foram realizadas as coletas do material vegetal (escala 1:1:500.000). FONTE: PIATAM, 2011.....24
- Figura 3** – Visualização das amostras de DNA de 10 indivíduos de *Astrocaryum jauari* em gel de agarose 0,8% corado com gel red.....31
- Figura 4** – Histograma de distribuição das frequências alélicas dos *loci* Aac03, Aac04 e Aac05 nas populações de Jauari (*Astrocaryum jauari*).....34
- Figura 5** – Histograma de distribuição das frequências alélicas dos *loci* Aac06, Aac07 e Aac10 nas populações de Jauari (*Astrocaryum jauari*).....35
- Figura 6** – Histograma de distribuição das frequências alélicas dos *loci* Aac12, Aac13 e Aac14 nas populações de Jauari (*Astrocaryum jauari*).....36
- Figura 7:** Dendrograma de UPGMA das populações de *Astrocaryum jauari*, calculado de acordo com a identidade genética de Nei (1978). Os números descritos nos ramos foram obtidos para teste de bootstrap após 1.000 reamostragens.....40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Locais de coleta e coordenadas geográficas (latitude e longitude).....**24**
- Tabela 2.** Sinopse das características dos oito *loci* de seqüências simples repetidas de Tucumã transferidas para Jauari.....**28**
- Tabela 3:** Índices de diversidade genética para os nove *loci* do conjunto. A – Número de alelos; H_o – Heterozigosidade observada; H_e – Heterozigosidade esperada; $H_{máx}$ – Máxima diversidade possível em cada loco e $\hat{H}_e/\hat{H}_{máx}$ – é a proporção da diversidade máxima.....**33**
- Tabela 4:** Classificação do número de alelos de acordo com sua frequência e distribuição entre amostras de Jauari (*Astrocaryum jauari*) de três populações considerando quatro *loci* microssatélites.....**33**
- Tabela 5:** Índices de diversidade genética, de nove *loci* microssatélites para amostras de Jauari (*Astrocaryum jauari*) para as três populações. A – Número de alelos; P – Número de Alelos Privados; H_o – Heterozigosidade observada; H_e – Heterozigosidade esperada.....**37**
- Tabela 6** – Resultado da análise de variância (AMOVA) das três populações de (*Astrocaryum jauari*) para todos os *loci* microssatélites estudados.....**39**
- Tabela 7:** Matriz de distância genética entre as três populações de *Astrocaryum jauari*, sendo (1) população Santa Luzia do Buiuçuzinho, (2) População Matrinxã e (3) População Nossa Senhora das Graças.....**41**

RESUMO

A Amazônia possui valioso reservatório de recursos genéticos relacionados à espécies de palmeiras, entre elas, podemos destacar o jauari (*Astrocaryum jauari* Martius), uma espécie não domesticada, verificada como de alta dispersão, sendo a palmeira mais frequente nos igapós do Rio Negro, na Amazônia brasileira. Espécie muito explorada até a década de 90 para extração de palmito, que constituiu a base da produção industrial de palmito na Amazônia Central, porém, pouco estudada quando comparada as espécies como pupunha, açaí e tucumã. A alta ocorrência de populações naturais dessa palmeira pode ser associada a alternativas visando buscar melhorias na qualidade de vida das populações locais e desenvolvimento comunitário, mas para isto torna-se necessária a ampliação dos estudos básicos e aplicados para um melhor conhecimento de sua diversidade, ocupação no ecossistema, evolução, adaptação e desenvolvimento de métodos adequados para o manejo e utilização de seu potencial. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a variabilidade genética de populações de jauari na Amazônia, utilizando marcadores microssatélites. Foram coletadas trinta amostras de folhas de jauari de três populações (Santa Luzia do Buiuçuzinho, Matrinxã e Nossa senhora das Graças) e analisadas utilizando nove *loci* microssatélites (Aac03, Aac04, Aac05, Aac06, Aac07, Aac10, Aac12, Aac13 e Aac14) desenvolvidos para tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) e transferidos com sucesso para jauari. Foram detectados 47 alelos com média de 5,2 alelos por loco, sendo menor em Aac03, Aac05, Aac10 e Aac13 (3 alelos) e maior em Aac04 (9 alelos), confirmando o alto conteúdo de informação genética deste tipo de marcador para estudos genéticos em palmeiras. Os alelos foram classificados de acordo com suas frequências e distribuição entre as populações. Um total de treze alelos foi classificado como raros (frequência < 0,05), dezenove alelos como intermediários (frequência entre 0,05 e 0,2), e quinze comum (>0,2). Foram detectados oito alelos privados destes, quatro encontrados na população Nossa Senhora das Graças, nove alelos esporádicos (presentes em duas populações) e 30 difundidos (presente nas três populações). As heterozigosidades observadas (H_o) foram superiores a heterozigosidade esperada (H_e) em 89% dos *loci*. A heterozigosidade média observada foi maior em Santa Luzia do Buiuçuzinho ($H_o=0,77$) e menor em Matrinxã ($H_o=0,70$). Divergência genética moderada foi observada entre as populações ($F_{st}=0,12$). A análise da variância molecular (AMOVA) revelou que as populações estudadas de jauari apresentam maior variabilidade genética dentro das populações (87,75%), e uma variabilidade menor entre as populações (12,25%). O dendrograma construído com base nos marcadores SSR revelou a formação de dois grupos, mostrando que as populações de Santa Luzia do Buiuçuzinho e Matrinxã são as mais semelhantes geneticamente. Os resultados obtidos mostraram que as distâncias genéticas não estão correlacionadas com a distância geográfica. No entanto, foi encontrada alta diversidade genética intrapopulacional que poderá ser utilizada em programas de melhoramento.

Palavras chave: Variabilidade genética, palmeiras, marcadores microssatélites.

ABSTRACT

The Amazon has valuable reservoir of genetic resources related to species of palms, which we highlight the jauari (*Astrocaryum jauari* Martius), a non-domesticated specie, verified as high dispersion and is the most common palm in flooded areas of the Rio Negro, in Brazilian Amazon. Specie very explored till 90s for the extraction of palm, which formed the basis of industrial production of palm in Central Amazonia, however, not very studied compared species like peach palm, acaí and tucumã. The high occurrence of natural populations of this palm can be associated with alternatives seeking improvements in quality of life of local populations and community development, but for this is necessary the expansion of basic and applied studies for a better understanding of its diversity, occupation of ecosystem, evolution, adaptation and development of suitable methods for the management and use of this potential. The objective of this study was to characterize the genetic variability of populations of jauari in Amazon, using microsatellite markers. Thirty samples were collected from leaves of jauari of three populations (Santa Luzia do Buiuçuzinho, Matrinxã and Nossa Senhora das Graças) and analyzed using nine microsatellite loci (Aac03, Aac04, Aac05, Aac06, Aac07, Aac10, Aac12, and Aac13 Aac14) developed for tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) and transferred successfully to jauari. It was detected 47 alleles with an average of 5.2 alleles per locus being lower in Aac03, Aac05, Aac10 Aac13 and (3 alleles) and higher in Aac04 (9 alleles), confirming the high information content of this kind of genetic marker for genetic studies of palms. The alleles were classified according to their frequency and distribution among populations. A total of thirteen alleles was classified as rare (frequency <0.05), nineteen alleles as intermediaries (often between 0.05 and 0.2), and fifteen common (> 0.2). Eight private alleles were detected, four of these were found in population Nossa Senhora das Graças; nine sporadic alleles (present in two populations) and 30 broadcast (present in all three populations). The observed heterozygosity (H_o) were higher than the expected heterozygosity (H_e) in 89% of loci. The average of observed heterozygosity was higher in Santa Luzia do Buiuçuzinho ($H_o = 0.77$) and lowest in Matrinxã ($H_o = 0.70$). Moderate genetic divergence was observed among populations ($F_{st} = 0.12$). The analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that the populations studied jauari have greater genetic variability within populations (87.75%), and a lower variability among populations (12.25%). The dendrogram based on SSR markers revealed the formation of two groups, showing that the populations of Santa Luzia do Buiuçuzinho and Matrinxã are more genetically similar. The results showed that genetic distances are not correlated with geographic distance. However, it was found high intrapopulation genetic diversity that can be used in breeding programs.

Keywords: Genetic variability, palm, microsatellite markers.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	12
2.2. Objetivos Específicos:	12
3. REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1. Palmeiras.....	13
3.1.1 Classificação taxonômica de <i>Astrocaryum jauari</i> Mart.....	14
3.1.2 Descrição da espécie	14
3.1.3 Distribuição geográfica e ecologia da espécie	15
3.1.4 Importância e uso da espécie.....	15
3.2 Estudo da variabilidade.....	16
3.3 Marcadores moleculares	17
3.3.1. Marcadores Microssatélites.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Coleta do Material e Extração de DNA	24
4.2. Quantificação e Diluição do DNA.....	27
4.3. Amplificação dos <i>loci</i> microssatélites no DNA de Jauari	27
4.3.1. Reação da polimerase em cadeia (PCR) dos <i>primers</i>	28
4.3.2. Diluição e genotipagem dos <i>loci</i>	29
4.4. Análise estatística dos dados.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1. Extração de DNA.....	31
5.2. Diversidade alélica dos <i>loci</i> microssatélites	31
5.3. Diversidade Genética entre e dentro das populações.....	38
5.4. Análise do Dendograma.....	39
6. CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	44

INTRODUÇÃO

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

A Amazônia possui valioso reservatório de recursos genéticos relacionados a espécies de palmeiras, entre elas, podemos destacar tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer), açaí (*Euterpe precatoria* var. *precatoria* Martius), pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth), urucuri (*Attalea* spp.), bacaba (*Oenocarpus bacaba* Martius), inajá (*Maximiliana maripa* (Aublet) Drude), buriti (*Mauritia flexuosa* Linnaeus filius), murumuru (*Astrocaryum murumuru* Martius), jauari (*Astrocaryum jauari* Mart.) entre outras (MIRANDA et al., 2001). Algumas espécies como pupunha, açaí e tucumã têm sido relatadas com maior frequência na literatura, no entanto outras como jauari, poucas informações estão disponíveis. Próximo a comunidades isoladas na área de influência do gasoduto Coari-Manaus, Nossa Senhora das Graças, Matrinxã e Santa Luzia do Buiuçuzinho foram observadas várias populações de palmeiras nativas, entre elas, jauari. A alta ocorrência de populações dessa palmeira pode ser associada a alternativas visando buscar melhorias na qualidade de vida das populações locais e desenvolvimento comunitário (FRAXE et al., 2007). Neste sentido, os recursos locais e nativos devem ser valorizados, estudados, e verificadas as possibilidades de se converter os

recursos naturais em benefícios para o desenvolvimento de comunidades isoladas e de difícil acesso.

Segundo Clement et al., (1982) é necessário conhecer e caracterizar a diversidade genética de espécies vegetais da Amazônia, pois a maioria das espécies amazônicas ainda é pouco conhecida quanto ao potencial de exploração econômico e sua contribuição para o bem-estar humano, assim como na economia nacional. Desta forma, para proporcionar o aproveitamento do potencial econômico das palmeiras regionais e a incorporação à lista de produtos comerciais, torna-se necessária a ampliação dos estudos básicos e aplicados para um melhor conhecimento de sua diversidade, ocupação no ecossistema, evolução, adaptação e desenvolvimento de métodos adequados para o manejo e utilização de seu potencial (MIRANDA et al., 2001).

O Jauari (*Astrocaryum jauari* Martius) é a palmeira mais frequente nos igapós do Rio Negro, na Amazônia brasileira, medindo em torno de 20 m de altura, encontrada raramente isolada e comumente formando touceiras com 4 a 6 indivíduos de tamanhos distintos, oriundos a partir de uma única planta. A abscisão dos frutos ocorre durante o pico das cheias e início da descida das águas, sendo estes consumidos por peixes. A palmeira tem valor comercial sendo dela extraído palmito que, por cerca de 20 anos, até 1998, constituiu a base da produção industrial de palmito na Amazônia Central (PIEIDADE et al., 2003). O palmito é grande e saboroso. A raque foliar é usada para tecer, pois a mesma fornece fibras utilizadas na confecção de redes e tecidos grosseiros. Os frutos são muito procurados por peixes, sendo por esta razão utilizados como isca para pescaria. O endocarpo é duro e preto, sendo importante fonte de matéria prima na confecção artesanal de colares, pulseiras, além de ser utilizada no fornecimento de alimento para a criação de peixes em sistemas agroflorestais (BORGTOFT; BALSLEV (1990) apud HENDERSON et al. (1995) LORENZI, 2004; HENDERSON, 1995).

A exploração desordenada dos recursos naturais tem gerado a degradação de várias áreas. Sempre existe risco de erosão genética em populações naturais, em função da perturbação antrópica, que gera entre outros aspectos, a destruição de *habitats* e a fragmentação de populações naturais. Essa alteração pode acarretar uma limitação evolutiva para as espécies que compõem a biodiversidade. Com o aumento do interesse em recursos genéticos vegetais, pelo setor industrial, aliado ao risco da erosão genética que estes vêm sofrendo, ressalta-se a necessidade de estudá-los de modo mais extensivo e com maior profundidade (ZIMBACK et al., 2004).

A obtenção de germoplasma com variabilidade genética nas diferentes espécies vegetais é base para iniciar qualquer programa de melhoramento. Portanto, conhecer os níveis de distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações de palmeiras subsidiará os planos de uso e conservação dos recursos genéticos de determinada espécie, além de direcionar os passos para desenvolvimento de programas de melhoramento.

Os marcadores moleculares são úteis no estudo da diversidade genética, entre estes os marcadores de Sequências Simples Repetidas (SSR) (RAFASKI et al., 1996).

Neste trabalho propôs-se o uso de marcadores moleculares do tipo microssatélites, no estudo de populações naturais de *A. jauari*, na área do gasoduto Coari- Manaus, espécie ainda não domesticada, para qual o conhecimento da organização da variabilidade genética das populações naturais é imprescindível para gerar informações de importância para o uso e conservação dos recursos genéticos desta espécie.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

- Avaliar a diversidade genética de jauari (*Astrocaryum jauari* Mart.) visando o conhecimento e a organização da variabilidade genética dessa espécie.

2.2. Objetivos Específicos:

- Otimizar protocolos de Extração de DNA para jauari;
- Caracterizar a diversidade genética de indivíduos de populações naturais de jauari utilizando marcadores microssatélites;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Palmeiras

As palmeiras são plantas pertencentes à família *Arecaceae* e caracterizam-se por produzir frutos apreciados como a pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth.), buriti (*Mauritia flexuosa* L.), tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer.), coco (*Cocos nucifera* L.), açai (*Euterpe oleracea* Mart. e *Euterpe precatória* Mart.) assim como frutos com grande potencial econômico, mas ainda pouco manejados, como urucuri (*Attalea* spp.), inajá (*Maximiliana maripa* (Aublet) Drude) e o jauari (*Astrocaryum jauari* Mart.).

As palmeiras são numerosas em espécies e em tipos biológicos, consideradas ótimos marcadores ecológicos e desempenhando um papel destacado no funcionamento dos ecossistemas florestais (KAHN; MOUSSA, 1994). São ainda, abundantes, produtivas, e foram muito importantes na subsistência de povos indígenas, algumas ainda são importantes na subsistência de populações tradicionais (CLEMENT et al., 2005). No caso das palmeiras nativas da Amazônia, embora com grande potencial para o desenvolvimento agrícola da região, a maior parte encontra-se em condição selvagem ou semi-selvagem e não existem sementes melhoradas e nem sistemas de produção recomendados para o plantio.

Além do potencial alimentar, as palmeiras podem fornecer uma série de itens como gorduras, óleos, essências, resinas, fibras, madeira e possuem também um grande potencial paisagístico (MIRANDA; RABELO, 2006). Além da Amazônia as palmeiras também são um elemento presente em praticamente todas as formações vegetais brasileiras (SOUZA; LORENZI, 2005).

3.1.1 Classificação taxonômica de *Astrocaryum jauari* Mart.

O jauari pertence à classe Equisetopsida, subclasse Magnoliidae, Superordem Liliales, Ordem Arecales, família Arecaceae, subfamília Arecoideae, tribo Cocoseae, subtribo Bactridinae, gênero *Astrocaryum* e espécie *Astrocaryum jauari* Mart. (USDA, 2011; MOBOT, 2011).

3.1.2 Descrição da espécie

O jauari é uma palmeira multicaule, com caule medindo de 5 a 20 m de altura e variando de 9 a 30 cm de diâmetro (Figura 1), com espinhos negros e achatados de 10 a 14 cm de comprimento nos entrenós e com um cone de raízes na base. Suas folhas são pinadas, em número de 6 a 10; bainha com 0,5 a 1,7 m de comprimento, fechada na base; bainha, pecíolo e raque moderadamente até densamente cobertos com espinhos achatados de cor negra ou cinza; pecíolo com 0,6 a 1,5 m de comprimento; raque com 1,5 a 2,6 m de comprimento; pinas lineares, em número de 56 a 148 de cada lado da raque, distribuídas irregularmente em grupos de 3 a 7, e dispostas em diferentes planos, as da porção mediana da folha de 0,6 a 1,1 m de comprimento e 2 a 3 cm de largura. Inflorescências interfoliares, ramificadas, eretas; pedúnculo com 65 a 115 cm de comprimento; bráctea peduncular lenhosa com cerca de 1,1 m de comprimento. Frutos globosos, globoso-elipsóides ou obovóides, com 2,5 a 5,0 cm de comprimento e 1,7 a 3,0 cm de diâmetro, de epicarpo liso e de cor verde-alaranjada quando maduros (Figura 1) (MIRANDA et al., 2001; LORENZI, 2004).



Figura 1 - *Astrocaryum jauari* Mart. em ambiente natural e frutos da espécie.
 FONTE: LABPALM, 2011.

3.1.3 Distribuição geográfica e ecologia da espécie

A. jauari Mart. está distribuída em toda região amazônica da Colômbia, Venezuela, das Guianas, Equador, Peru e Brasil (HENDERSON, 1995). É uma espécie muito freqüente e abundante na floresta amazônica, em áreas úmidas e periodicamente inundadas, ao longo das beiras dos rios de águas pretas e lagos. O ciclo reprodutivo parece estar associada com a variação anual do nível do rio. O período de maturação dos frutos coincide com o pico de cheia dos rios, os quais caem na água, e são muito importantes na dieta de peixes e alguns répteis da região. A água é a grande dispersora de suas sementes (PIEIDADE, 1985; HENDERSON, 1995). Schluter et al. (1993) apud Henderson et al. (1995), estudaram as adaptações fisiológicas e anatômicas de mudas de terrenos inundados e observaram que plantas jovens ficaram submersas por até 300 dias no ano.

3.1.4 Importância e uso da espécie

O comércio de palmito foi bastante explorado no Rio Negro no Brasil, onde esta espécie é extremamente abundante. O palmito é grande, saboroso e muito apreciado pela população regional. A raque foliar é usada para tecer, pois a mesma fornece fibras utilizadas

na confecção de redes e tecidos grosseiros. Os frutos são muito procurados por peixes, sendo por esta razão utilizados como isca para pescaria. O endocarpo é duro e preto, sendo importante fonte de matéria prima na confecção artesanal de colares e pulseiras (LORENZI, 2004; HENDERSON, 1995).

Borgtoft e Balslev (1990) apud Henderson et al. (1995) consideram que esta espécie pode ser utilizada no fornecimento de alimento para a criação de peixes em sistemas agroflorestais.

3.2 Estudo da variabilidade

Para a conservação de uma espécie é necessário entender sua biologia e ciclo de vida incluindo movimentos de dispersão, o comportamento reprodutivo, e os processos históricos aliados a fatores como barreiras ambientais. O conjunto desses fatores são os maiores responsáveis pela manutenção da variabilidade genética em populações (FRANKHAM et al., 2002). Sendo assim, é necessário estimar e conhecer a distribuição da variabilidade genética dentro e entre suas populações naturais (SPRUELL et al., 2003). Níveis altos de variabilidade genética geralmente são encontrados em populações naturais. Variações surgem em forma de mutações que são introduzidas na população por migração/fluxo gênico de indivíduos de outras populações e é perdida por endogamia, deriva genética e seleção natural (NEI, 1987).

Nas últimas décadas vêm se intensificando os estudos genéticos em populações de espécies arbóreas de florestas tropicais, com amostragens adequadas tanto de populações como dentro das mesmas, além do uso de tecnologias genéticas adequadas para quantificar essa diversidade (KAGEYAMA et al., 1998).

Na área de conservação genética, estudos vêm demonstrando que a redução das populações naturais tem levado a uma perda de genes adaptados a ambientes específicos de ocorrência das espécies arbóreas. A redução contínua no tamanho das populações as submete

a perdas de variabilidade genética, por deriva genética (SEBBENN; ETTORI, 2001). A deriva pode causar a depressão por endogamia e conseqüentemente, reduzir a capacidade adaptativa, fertilidade, vigor, porte e produtividade, entre outras características (RITLAND, 1996).

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

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

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

3.3 Marcadores moleculares

Marcadores moleculares são sequências de DNA capazes de diferenciar dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente, eles têm sido empregados extensivamente e com sucesso na análise genética de plantas e na caracterização existente entre os indivíduos. Até meados da década de 60, os marcadores moleculares utilizados em estudo de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, normalmente fenótipos identificados visualmente, como cor da pétala, calvície ou nanismo.

Devido a isso, a disponibilidade desses marcadores era restrita a algumas espécies de plantas como: milho, tomate e ervilha.

O marcador molecular pode ser definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou determinado segmento específico de DNA que corresponde a uma região do genoma que pode ser expresso ou não. A sequência de um marcador molecular pode ser conhecida ou não (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A revolução dos marcadores moleculares teve seu início com o surgimento dos marcadores bioquímicos, conhecidos como isoenzimas. O número de marcadores genéticos disponíveis foi aumentando bem como sua aplicabilidade que passou a incluir todas as espécies de plantas e animais. Nos últimos anos, com os avanços da genética, da biologia molecular, o advento da tecnologia de DNA recombinante, da reação em cadeia da polimerase (PCR) e do seqüenciamento automático do DNA, desenvolveu-se técnicas que utilizam marcadores genéticos que são úteis para auxiliar na identificação, caracterização e avaliação dos recursos genéticos vegetais (FALEIRO, 2007). Através desses avanços, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismos da molécula de DNA. Os marcadores moleculares de DNA permitiram uma maior cobertura genômica, quando comparados com as isoenzimas.

Os marcadores genético-moleculares possuem uma base genética que os identifica e os diferencia uns dos outros e sua expressão genética pode ser definida como dominante ou co-dominante, a seqüência de nucleotídeos, algumas apresentam ou não o conhecimento prévio de sua seqüência; e suas aplicações variam desde *Fingerprinting*, diversidade genética, mapeamento genético, análise filogenética, taxonomia interespecífica, diversidade funcional, estudos de expressão gênica e diversidade (FALEIRO, 2007).

As principais tecnologias disponíveis para a obtenção de marcadores genético-moleculares são: a) Isoenzimas (grupo de múltiplas formas moleculares de uma enzima, resultante de variações alélicas dos genes codificadores); b) *Random Amplified Polymorphic*

DNA–RAPD (fragmentos de DNA amplificados pela reação em cadeia da polimerase–PCR, utilizando *primers* curtos de 10 nucleotídeos); c) *Restriction Fragment Length Polymorphism–RFLP* (fragmentos de DNA obtidos de enzimas de restrição, separada por eletroforeses e visualizada por radioatividade); d) *Amplified Fragment Length Polymorphism–AFLP* (fragmentos de 80 a 500 pb de DNA obtidos da digestão do DNA com enzimas de restrição, seguidos da ligação de oligonucleotídeos, adaptadores e amplificação seletiva dos fragmentos via PCR); e) Minissatélites (unidades de 10 a 100 pb repetidas em *tandem*, flanqueadas por sítios conservados de endonucleases de restrição); f) *Cleaved Amplified Polymorphic Sequence–CAPS* (fragmentos de DNA amplificados via PCR, utilizando-se de *primers* específicos de 20 a 30 pb, seguidos de digestão com endonucleases de restrição); g) *Single-Strand Conformation Polymorphism–SSCP* (fragmentos de DNA de 200 a 800 pb amplificados via PCR usando *primers* específicos); h) *Inter Simple Sequence Repeats–ISSR* (fragmentos de DNA de 100 a 3000 pb amplificação via PCR usando um único *primer* de 16-20 pb, construído a partir de Microssatélites); i) *PCR-Sequencing* (envolve seqüências de nucleotídeos do fragmento de DNA amplificado via PCR utilizando *primers* específicos de 15 a 30 pb, para dada região do genoma em estudo); j) Marcadores baseados em retrotransposons (classe mais comum de transposons e ocorre em grande número de cópias em genomas de plantas); l) Marcadores baseados em genômica funcional (direcionado a genes de interesse); m) *Single Nucleotide Polymorphism–SNP* (utilizado para identificar mutações e polimorfismos baseados na posição de um único nucleotídeo) (FALEIRO, 2007).

Os marcadores moleculares podem ser separados em dois grupos, os codominantes, por exemplo (RFLP, SSR, isoenzimas) e os dominantes (RAPD, AFLP). No caso dos dominantes, os alelos de um mesmo loco são revelados pela presença ou ausência de uma banda que, por sua vez, resulta da amplificação de um fragmento de determinado tamanho que é visualizado no gel. No entanto, não é possível saber se o loco amplificado está em

homozigose ou heterozigose. Sendo assim, marcadores dominantes, ao contrário dos codominantes, não permitem a distinção entre genótipos homozigóticos e heterozigóticos os quais constituem apenas uma classe, isto é, a que apresenta o alelo amplificado. Os indivíduos nos quais o alelo não é amplificado constituem a outra classe, considerada homozigótica para ausência da banda, qualquer que seja o motivo pelo qual o fragmento não foi amplificado (LOPES et al., 2003).

3.3.1. Marcadores Microsatélites

Os genomas eucariotos são densamente povoados por sequências simples repetidas, as quais consistem em um a seis nucleotídeos repetidos em tandem. Estas seqüências simples são denominadas pelos seguintes sinônimos: Sequências Simples repetidas-SSR (*Sequence Simple Repeats*), ou Sítios de Microsatélites Marcados por Sequência – STMS (*Sequence Tagged Microsatellite Site*), Sequências Simples Repetidas por Polimorfismo – SSRP (*Simple Sequence Repeat Polymorphism*) ou Microsatélites (BUSO et al ., 2003; LI, 2002; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; GUPTA; VARSHNEY, 2000; SELKOE; TOONEN 2006).

As sequências de DNA que flanqueiam os microsatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo seleção de *primers* específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos.

Buso et al. (2003); Li (2002); Selkoe e Toonen (2006) evidenciam que os SSR são um dos marcadores mais polimórficos encontrados nos genomas de animais e plantas hoje em dia, e caracterizam-se por uma seqüência de 1 a 6 nucleotídeos de comprimento que pode estar repetidas em *tandem* (seqüência de um fragmento de DNA que vai desde um par até cinco ou

seis pares de bases, que se repetem de maneira consecutiva, originando diferentes alelos, dos quais se distinguem entre eles pela longitude total do fragmento).

Os microssatélites são regiões do genoma que estão submetidas a taxas de mutação elevadas, variando entre 10^{-2} a 10^{-6} nucleotídeos/loco/por geração (HOELZEL, 1998; SCHLÖTTERER, 2000). Algumas hipóteses sobre os processos mutacionais foram sugeridas para explicar os mecanismos que levam a altas taxas de mutação: o *Crossing over* desigual que ocorre durante o pareamento meiótico devido à natureza repetida das sequências nucleotídicas (JEFREYS et al., 1994) e os escorregões ou deslizamento da DNA polimerase (*slippage*) durante o processo de replicação (LEVINSON; GUTMAN, 1987). Neste processo, surgem repetições de DNA através de mutações do tipo inserções e deleções (*indels*), que duplicam ou eliminam sequências adjacentes (ROSE; FALUSH, 1998; ZHU et al., 2000).

Marcadores moleculares codominantes têm sido usados nos estudos genéticos de populações naturais e nos programas de melhoramento, auxiliando a seleção de genótipos superiores. Entre esta classe de marcadores, os marcadores seqüências simples repetidas (SSR) ou microssatélites são os que mais se aproximam ao marcador ideal para estudos de genética de populações (RAFASKI et al., 1996). Isto se deve ao fato de tais marcadores possuírem características extremamente favoráveis para este fim (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). Dentre elas destacam-se: são abundantes e uniformemente distribuídos por todo o genoma; são tipicamente codominantes; são altamente multi-alelicos, apresentando o maior conteúdo informativo por locus entre todas as classes de marcadores moleculares; são obtidos através de amplificação via PCR; são automatizáveis em sistemas multiplex, o que permite avaliar rapidamente um grande número de indivíduos para um grande número de loci em pouco tempo; podem ser transferidos dentro de espécies de um mesmo gênero; uma vez desenvolvidos, podem ser compartilhados entre diferentes laboratórios. Devido à expressão codominante e ao multi-alelismo, os marcadores SSR são os

que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo na terminologia de marcadores moleculares. (MILACH, 1998).

Os microssatélites em plantas são cerca de cinco vezes menos abundantes do que em humanos, onde ocorre um microssatélite (maior que 20 pb) a cada 6 Kb. Nas monocotiledôneas, é esperado um microssatélite a cada 65 Kb, enquanto nas dicotiledôneas, um SSR a cada 21 Kb. Em milho, estima-se que ocorra um SSR a cada 58 Kb (WANG et al., 1994). Em plantas um dos primeiros trabalhos publicados descrevendo estes marcadores foi em espécies arbóreas tropicais (CONDIT; HUBBELL, 1991), na qual foram detectadas grande abundância de dinucleotídeos repetidos do tipo AG e AC no genoma de plantas. Powell et al., (1996) observaram que em animais e em humanos, a abundância de microssatélites é superior em relação à encontrada em plantas. O tipo de dinucleotídeo repetido mais freqüente em plantas é AT seguido pelo AG e pelo AC (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996); entretanto os microssatélites desenvolvidos para motivos AT são raros devido à autocomplementariedade das sondas utilizadas durante o desenvolvimento dos marcadores com este tipo de dinucleotídeo repetido (RAFASKI et al., 1996). A quantidade de AG e AC em plantas varia de espécie para espécie; em *Pinus*, por exemplo, a quantidade de AC é duas vezes maior que a de AG (ECHT & MAY-MARQUARDT, 1997). A maioria dos trabalhos apresenta *primers* que amplificam regiões de microssatélites dinucleotídeos, possivelmente devido estas regiões serem mais abundantes do que os tri e tetranucleotídeo.

Apesar de todas estas vantagens demonstradas pelos microssatélites, a utilização em larga escala tem um custo elevado, como por exemplo, para a síntese de *primers* específicos (principalmente marcados com fluorescência) para a amplificação dos locos por PCR, demandam tempo e possuem uma complexidade metodológica, requer tecnologias para o seu desenvolvimento, além de um laboratório equipado com aparelhos utilizados em rotinas de

biologia molecular necessários para este fim que nem sempre é disponível nas instituições de pesquisa, (RODRIGUES, 2007; BATISTA, 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta do Material e Extração de DNA

Foram estudadas três populações espontâneas de jauari de comunidades do Estado do Amazonas sob influência do gasoduto Coari-Manaus: Santa Luzia do Buiuçuzinho no município de Coari, Nossa Senhora das Graças, no município de Manacapuru e Matrinxã, no município de Codajás (Tabela 1) (Figura 2). A coleta foi realizada no período compreendido entre 13 a 23 de março de 2007.

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

Comunidade	Município	Cordenadas	
		Latitude	Longitude
Santa Luzia do Buiuçuzinho	Coari	04 ^o 11'60" S	63 ^o 42'33" W
Matrinxã	Codajás	03 ^o 46'44" S	62 ^o 21'54" W
Nossa Senhora das Graças	Manacapuru	03 ^o 20'37" S	60 ^o 35'34" W



Figura 2 – Imagem de satélite da localização das comunidades em que foram realizadas as coletas do material vegetal (escala 1:1:500.000). FONTE: PIATAM, 2011.

Para o estudo da diversidade genética entre e dentro das populações de cada espécie analisou-se 30 indivíduos adultos de cada população onde a planta foi devidamente marcada e sua posição geográfica registrada usando o Sistema de Posicionamento Global (GPS). Amostras das folhas coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos com sílica gel e levadas para o laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas, para serem submetidas à extração de DNA. Foi feito um levantamento das populações da palmeira jauari em áreas de fácil acesso pelo homem, próximo às comunidades sob influência do gasoduto Coari-Manaus, para dar subsídios à exploração e à conservação.

O DNA genômico total de plantas de cada espécie foi extraído a partir de amostras das folhas usando o método CTAB (*Cationic Hexadecyltrimethyl Ammonium Bromide*) descrito por Murray e Thompson (1980), com modificações.

Para o processo de extração de DNA foram utilizados 60 mg de tecido foliar seco, dos 90 indivíduos, sendo 30 de cada população.

Este material foi cortado em pedaços bem pequenos com o auxílio de tesoura. Cada uma das amostras foi colocada em cadinho de porcelana, adicionado nitrogênio líquido e macerados com o auxílio de bastão para a redução do tamanho das partículas.

Posteriormente, adicionou-se em cada amostra 1000 μL de tampão ou detergente de extração 2X CTAB (*Cationic Hexadecyltrimethyl Ammonium Bromide*) com dois μL de 2- β – mercaptoetanol e 50 μL de proteinase K, previamente aquecidos a uma temperatura de 60° C. O produto resultante da maceração de cada uma das amostras foi colocado em microtubos tipo *ependorf*[®], de 1,5 mL de capacidade, previamente identificados. Os tubos foram tampados e incubados em banho-maria a uma temperatura de 60 °C, durante 30 minutos. Entretanto, a cada 10 minutos, os tubos eram invertidos para homogeneizar a suspensão. Em seguida, foram colocados para esfriar e, logo após, adicionou-se 600 μL de Clorofórmio e

Álcool Isoamílico – CIA, na proporção 24:1. Feito isso, os tubos foram centrifugados a uma velocidade de 14.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, a solução dos tubos separou-se em duas fases, a superior ou aquosa (que contém os ácidos nucleicos) e a inferior ou orgânica (que contém proteínas, polissacarídeos e pigmentos). Pipetou-se toda a fase aquosa de cada uma das amostras, as quais foram depositadas em outros microtubos tipo *eppendorf*® previamente identificados. A fase inferior da solução dos tubos foi eliminada. Aos tubos contendo a fase aquosa, adicionaram-se 400 µL de isopropanol frio (-20 °C) e misturou-se devagar para permitir a precipitação do DNA. O material foi incubado por 24 horas (overnight) a -20 °C. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 7.500 rpm por 10 minutos.

Centrifugada, a solução dos tubos separou-se em duas fases, a superior e em maior quantidade que contém o isopropanol (que precipitou o DNA por ter tirado por competição as moléculas de água do DNA, a que as torna insolúveis) e a inferior que contém o *pellet* (DNA). Depois de localizado o *pellet*, realizou-se a eliminação do isopropanol sem afetar o *pellet*, em seguida colocou-se 1 mL de etanol 70% por cinco minutos, retirando-se em seguida o máximo possível deste etanol, sendo esta etapa realizada duas vezes, e deixando-os secar na capela até completa evaporação do etanol.

Posteriormente colocou-se 1 mL de etanol absoluto por três minutos, retirando-se em seguida o máximo possível deste etanol e deixando-se secar na capela por uma hora e meia. O *pellet* foi ressuspenso com 70 µL de uma solução tampão TE (Tris-HCl e EDTA) acrescido de RNase. O TE evita a degradação do DNA e a RNase permite a degradação das enzimas de RNA. Esta foi incubada por 2 horas a 37 °C e vortexada de 30 em 30 minutos para a digestão da RNase. O material final foi armazenado em um refrigerador a -20° C.

4.2. Quantificação e Diluição do DNA

Esta etapa foi realizada no Laboratório Temático de Biologia Molecular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. A quantificação do DNA genômico foi realizada em gel de agarose 0,8 % (p/v) por comparações visuais de sua fluorescência com padrões de massa molecular de 50, 100 e 200 ng/ μ L de DNA do fago lambda. Para coloração dos géis foi utilizado o gel red e posteriormente foram fotografados sob luz UV usando equipamento de fotodocumentação (Geldoc - Bio Rad). Depois de quantificados, todas as amostras de DNA foram diluídas em água ultrapura para a concentração de 10 ng/ μ L.

4.3. Amplificação dos *loci* microssatélites no DNA de Jauari

Foram avaliados oito pares de locos ou *primers* (Tabela 2) que foram desenvolvidos para tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), porém, transferidos e selecionados para a genotipagem de plantas de Jauari. Adicionou-se na extremidade 5' do *primer forward* de todos os lócus, a seqüência M13 (5' TGTAACACGACGGCCAGT 3') com um fluorocromo específico (6- FAM, HEX) que permite a fluorescência e identificação no sistema de detecção laser Megabase 1000 (GE Healthcare), segundo o protocolo descrito por Schuelke (2000) com algumas modificações.

Tabela 2. Sinopse das características dos oito *loci* de seqüências simples repetidas de Tucumã transferidas para Jauari.

SSR Locus	Genbank Acession N°	Motivo da repetição	Seqüência do <i>primer</i> (5' -3')	Ta (°C)	Comprimento do alelo (bp)	N° alelos
Aac03	GF111929	(TCCTAC)2	F:GCCTCCTTTAGTTCCTGCAC R:AGCATCGGACTTTCCAGGT	60	152-162	3
Aac04	GF111930	(GT)7(GA)16	F:GCATTGTCATCTGCAACCAC R:GCAGGGGCCATAAGTCATAA	60	205-237	9
Aac05	GF11931	(TACGCT)2	F:GTCCAATTCAGCTCGGCTT R:TTATGCAATGGTGGTGCTGT	64,2	390-432	3
Aac06	GF111932	(TC)19(AC)8	F:TCTGATCCATCTGGTTGTCTAA R:TGCATGGTGCTAGAGTAATCC	64	163-181	8
Aac07	GF111933	(GT)6	F:ACTTGTGCTGATACGCACG R:ACCTGGGGATGATGTGTAGC	55,2	222-242	6
Aac10	GF111936	(CT)7	F:AGCCGTGAGTGAAGTCTTT R:AAGCCCAAACCTTCTTCCTCG	60	99-131	3
Aac12	GF111938	(GC)5 (AC)3 aaac (AG)17	F:GCTCTGTAATCTCGGCTTCCT R:TCCAGTTCAAGCTCTCTCAGC	60	180-192	4
Aac13	GF111939	(CA)7	F:CTAGACAACCCAAGAGAGGGG R:TTGGAGAGTGGATGTAGGTGC	60	161-205	3
Aac14	GF111940	(CA)6(CG)7(CA)11(GA)11	F:GGCCAGTTGTGTTGATGAAA R:TTAAGCCCCTGGTGAAAACA	55	356-414	8

Ta: temperatura de anelamento

4.3.1. Reação da polimerase em cadeia (PCR) dos *primers*

O processo do PCR inicia-se com a preparação e distribuição da reação padrão ou PCR mix. O PCR foi realizado em 10 µL reação, contendo volumes de 2,4 µL de H₂O ultrapura; 5,0 µL de máster mix [1,0 µL de Ta 10X; 2,1 µL de dNTP's (1 mM); 0,6 µL de MgCl₂ (25 mM); 0,21 µL de Taq DNA Polimerase (Fermentas Life Sciences®) e 1,09 µL de

H₂O ultrapura]; 0,8 µL de *primer reverse* (2,5 mM/µL); 0,4 µL de *primer forward* (2,5 mM/µL); 0,4 µL de *primer* fluorescente M13 (5 mM/µL) e 1,0 µL de DNA (10 ng/µL).

Foram executadas em um termociclador *Veriti* (*Applied Biosystems*). As PCR's foram desenvolvidas em duas etapas, a primeira etapa consistiu para os *primers* e a segunda é específica para a ligação do M13. A primeira etapa inicia estabilizando a temperatura a 68°C por 2min e a 92°C por 30 s, logo é realizado 30 ciclos do processo de desnaturação a 92°C por 30 s, seguido do anelamento com temperatura de hibridação específica para cada par de iniciadores (Tabela 2) por 35 s e a extensão a 68°C por 35 s. Na segunda etapa do M13 foram realizados 15 ciclos do processo de desnaturação a 92°C por 20 s, seguido do anelamento a 53°C por 30 s e a extensão a 72°C por 30 s, finaliza com uma extensão a 72°C por 15 min seguida de 68°C por 30 min.

Cada produto de PCR foi verificado por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com 5,0 µL de azul red e fotodocumentado em sistema de fotodocumentação *Eagle Eye II* (Stratagene).

4.3.2. Diluição e genotipagem dos loci

Do produto obtido das PCRs, uma parte foi diluída em uma proporção de 10%, especificamente 5 µL do PCR é diluído em 45 µL de H₂O ultrapura para ser utilizada na genotipagem. Posteriormente os produtos de PCR foram levados para desnaturação por 3 minutos e eletroinjetados no analisador de DNA MegaBACE 1000 (GE Healthcare) e o tamanho dos alelos foi estimado com o programa FRAGMENT PROFILER v1.2 (GE Healthcare) usando o padrão de genotipagem ET-400 ROX (GE Healthcare).

4.4. Análise estatística dos dados

Foram calculadas as frequências alélicas para cada loco com auxílio do programa FSTAT v. 2.9.3.2 (GOUDET, 1995). O número de alelos (A), a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), foram calculados para cada loco e população com o programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2002) a máxima diversidade para cada loco H_{max} , calculado a partir do número de alelos observados, em que: $H_{max} = (A-1)/A$ e a proporção da diversidade máxima H_e/H_{max} .

O número de alelos privados (P – Definido como um alelo encontrado em uma única população) foi calculado usando o programa FSTAT v. 2.9.3.2 (GOUDET, 1995). Os alelos foram classificados como comum (frequência $> 0,2$), intermediário ($> 0,05$) ou raro ($< 0,05$), bem como privado (presente em apenas uma população), esporádico (presentes em duas) ou difundido (presente nas três populações), similar ao esquema de Marshall e Brown (1975).

Para determinar a estrutura genética entre e dentro das populações, uma análise hierárquica da variância molecular - AMOVA, (MICHALAKIS; EXCOFFIER, 1996) foi efetuada, usando o programa GENES (CRUZ, 2006). O grau de diferenciação das populações foi quantificado pela estimativa de F_{st} entre os pares com auxílio do Programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2002).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extração de DNA

Para a extração de DNA, inicialmente as amostras foliares foram maceradas no CTAB 2%, porém, a extração não foi satisfatória para a espécie *jauari*, então passou-se a utilizar nitrogênio líquido para a maceração do material vegetal, visando a redução do tamanho das partículas e posteriormente adicionou-se CTAB 2%, o que foi favorável a extração, evitando assim que houvesse degradação do DNA da amostra. A verificação da qualidade e quantidade de DNA foi realizada através da eletroforese para quantificação, mostrando um DNA em quantidade suficiente e de boa qualidade (Figura 3).

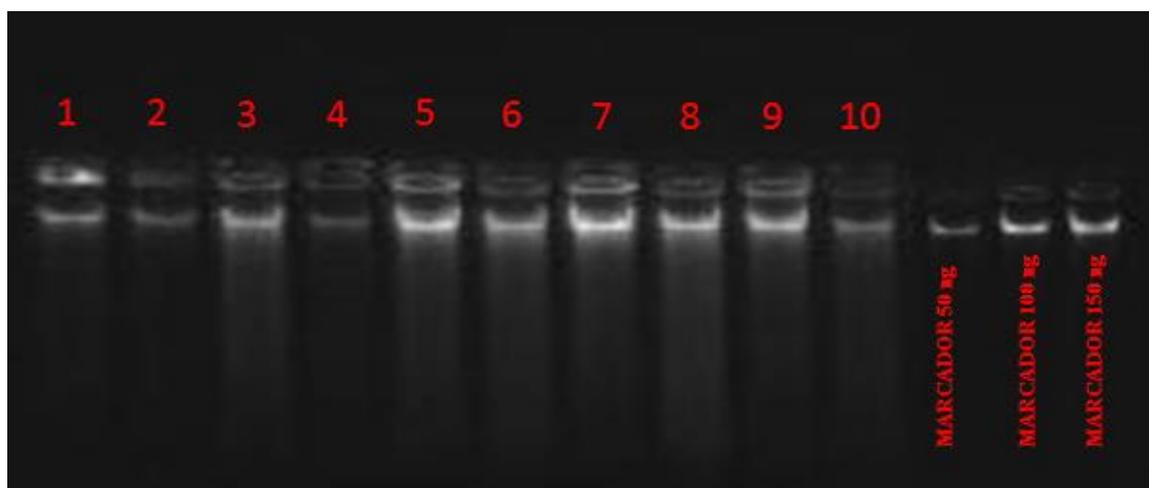


Figura 3 – Visualização das amostras de DNA de 10 indivíduos de *Astrocaryum jauari* em gel de agarose 0,8% corado com gel red.

5.2. Diversidade alélica dos *loci* microssatélites

Com a análise dos nove *loci* microssatélites polimórficos foi possível observar quarenta e sete alelos nas três populações, com média de 5,2 alelos por loco analisado, confirmando o alto conteúdo de informação genética com o uso deste tipo de marcador para

estudos genéticos em palmeiras. O número de alelos por loco variou entre os *loci* estudados sendo os mais polimórficos Aac04, Aac06 e Aac26 com 9, 8 e 8 alelos respectivamente, e os *loci* com menor polimorfismo foram Aac03, Aac05, Aac10 e Aac13 com três alelos (Tabela 3). A distribuição das frequências alélicas variou entre os *loci* e as populações.

Os alelos foram classificados segundo sua frequência alélica e distribuição entre as populações (Tabela 4 e Figura 3). Um total de 13 alelos foi classificado como raros, seis destes encontrados na população Nossa Senhora das Graças, sendo quatro destes alelos privados em um total de oito alelos privados de populações específicas. Cole et al. (2007) encontraram seis alelos raros privados em quatro populações de pupunheira cultivadas por comunidades indígenas e camponesas, mesmo utilizando três *loci* microssatélites, o que sugere que alelos privados são frequentes, como esperado pelas altas taxas de mutação. Para populações que apresentaram alelos raros ou privados, faz-se necessário a coleta de um maior número de indivíduos quando na criação de Bancos de Germoplasma e Programas de Melhoramento, isso aumentará a frequência desses alelos.

A diversidade gênica média ($H_e = 0,59$) (Tabela 3) foi bem próxima aos resultados encontrados por Bernardes (2008) em populações naturais de *Astrocaryum aculeatum* que foram de $H_e = 0,60$.

A diversidade genética máxima (H_{max}) representa o valor máximo teoricamente esperado da diversidade gênica (H_e) de acordo com o número observado de alelos (Tabela 3). No presente estudo, os marcadores SSR utilizados detectaram cerca de 74,9% da diversidade máxima possível. Considerando-se o modo como os parâmetros H_e e H_{max} são calculados, constata-se que a ocorrência de muitos alelos raros em uma população ocasiona um aumento proporcionalmente maior na estimativa de H_{max} , que considera apenas o número observado de alelos, em comparação a H_e , que considera frequências alélicas. Portanto, se uma população apresentar valores de H_{max} e H_e próximos, provavelmente, não deve possuir muitos alelos em

baixa frequência. Todavia, se ela apresentar valores elevados de H_{max} e valores relativamente mais baixos de H_e , conseqüentemente, ela terá menor porcentagem da máxima diversidade possível, o que indica que este loco apresenta maior número de alelos em baixa frequência (alelos raros). Os resultados nos confirmam isto, pois o loco Aac05 apresentou sete indivíduos com pelo menos um alelo em frequência $< 0,01$ dos três alelos verificados neste loco (Figura 5). O número total de alelos encontrados por população foi 41 para Santa Luzia do Buiçuzinho, 40 Nossa Senhora das Graças e 34 Matrinxã (Tabela 5).

A distribuição das frequências alélicas dentro de cada loco podem ser observadas nas figuras 4, 5 e 6.

Tabela 3: Índices de diversidade genética para os nove *loci* do conjunto. A – Número de alelos; H_o – Heterozigosidade observada; H_e – Heterozigosidade esperada; $H_{máx}$ – Máxima diversidade possível em cada loco e $\hat{H}_e/\hat{H}_{máx}$ – é a proporção da diversidade máxima.

Populações Jauari N=90					
Loco	A	H_e	H_o	$H_{máx}$	$H_e/H_{máx}(\%)$
Aac03	3	0,56	0,92	0,66	73,4
Aac04	9	0,78	0,84	0,88	50,6
Aac05	3	0,21	0,26	0,66	29,9
Aac06	8	0,77	0,88	0,87	49,1
Aac07	6	0,64	0,42	0,83	56,4
Aac10	3	0,49	0,82	0,66	71,9
Aac12	4	0,64	0,95	0,75	65,3
Aac13	3	0,59	0,94	0,66	74,9
Aac14	8	0,65	0,62	0,87	49,1
Média	5,2	0,59	0,74	0,76	57,8

Tabela 4: Classificação do número de alelos de acordo com sua frequência e distribuição entre amostras de Jauari (*Astrocaryum jauari*) de três populações considerando quatro *loci* microssatélites.

	Comum ($> 0,2$)	Intermediário ($> 0,05$ e $< 0,2$)	Raro ($< 0,05$)	Total
Privados	-	-	8	8
Esporádicos	-	5	4	9
Difundido	15	14	1	30
Total	15	19	13	47

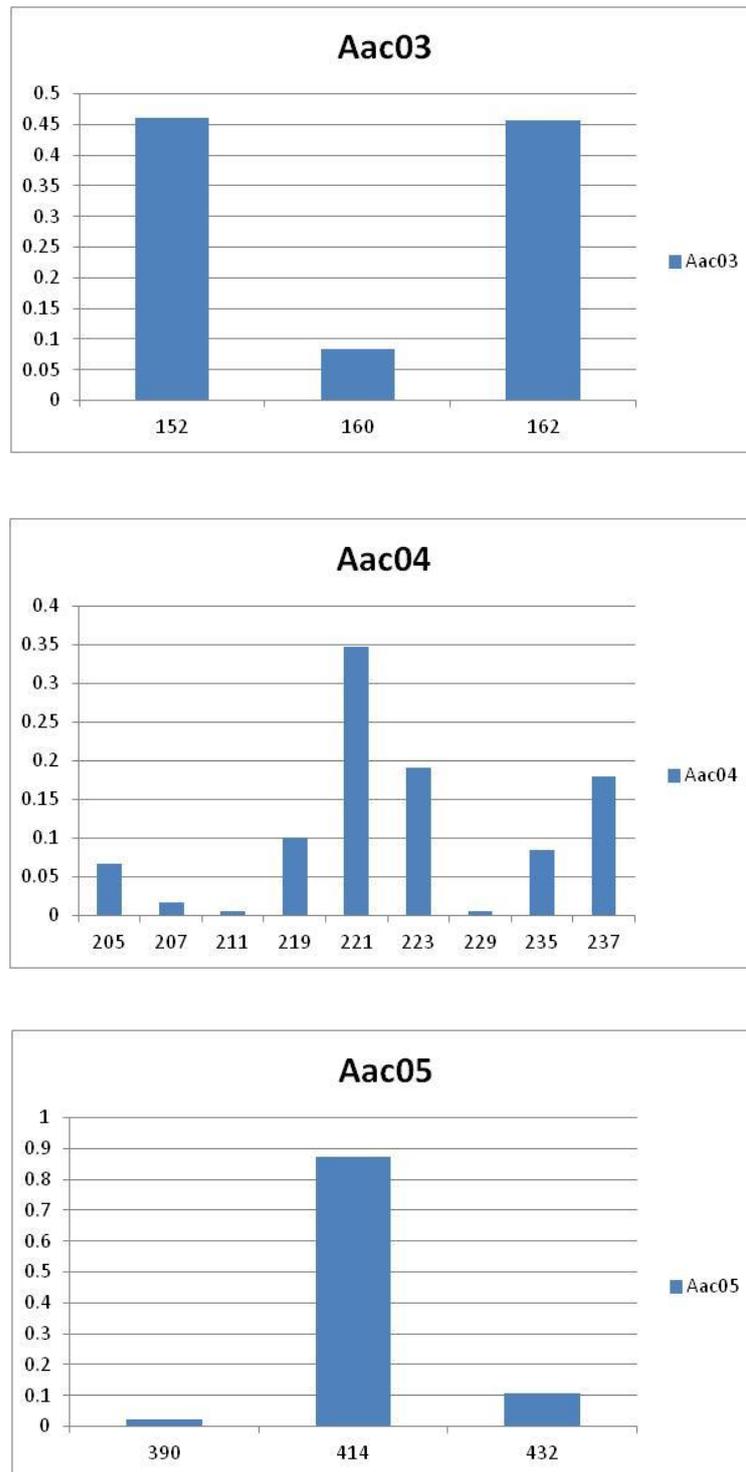


Figura 4 – Histograma de distribuição das frequências alélicas dos *loci* Aac03, Aac04 e Aac05 nas populações de Jauari (*Astrocaryum jauari*).

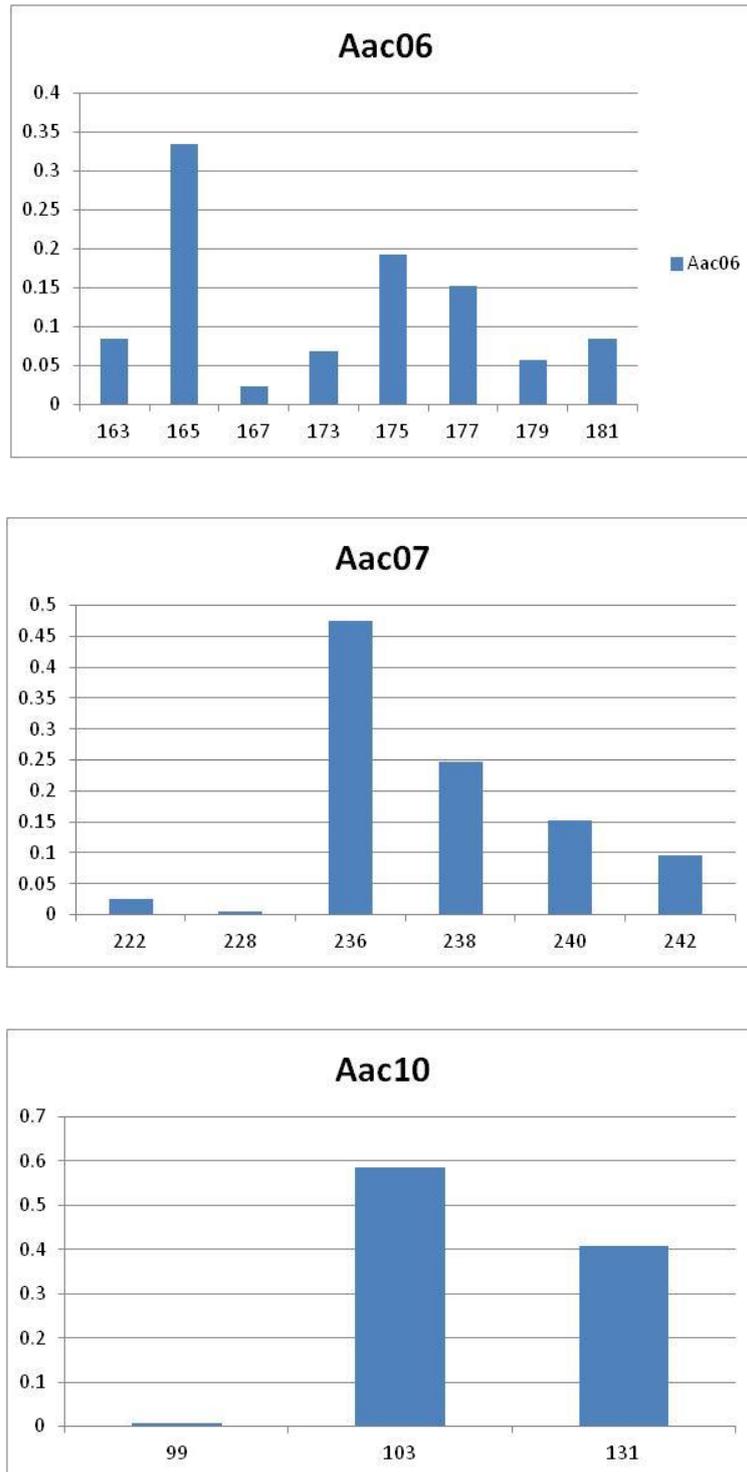


Figura 5 – Histograma de distribuição das frequências alélicas dos *loci* Aac06, Aac07 e Aac10 nas populações de Jauari (*Astrocaryum jauari*).

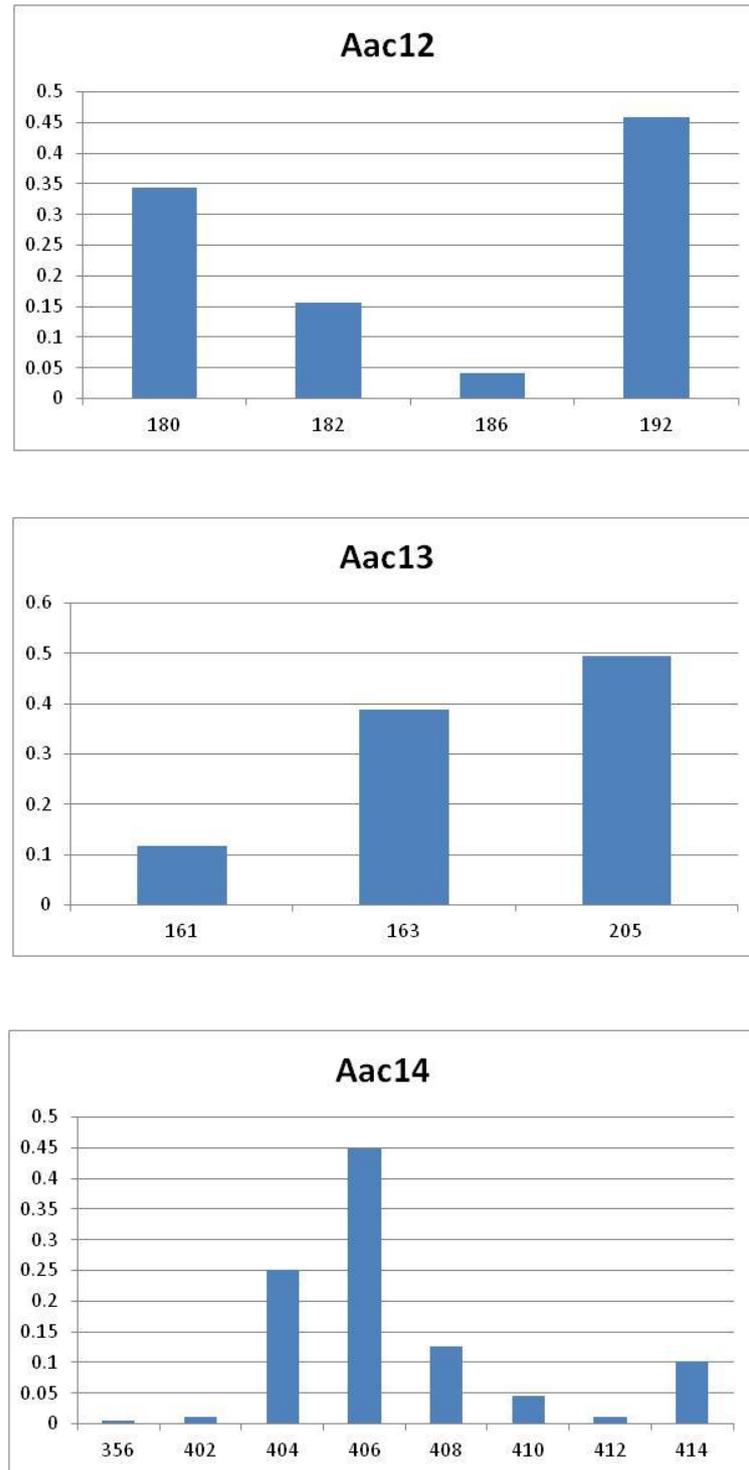


Figura 6 – Histograma de distribuição das frequências alélicas dos *loci* Aac12, Aac13 e Aac14 nas populações de Jauari (*Astrocaryum jauari*).

Tabela 5: Índices de diversidade genética, de nove *loci* microssatélites para amostras de Jauari (*Astrocaryum jauari*) para as três populações. *A* – Número de alelos; *P* – Número de Alelos Privados; *Ho* – Heterozigosidade observada; *He* – Heterozigosidade esperada

<i>Loci</i>	População				
	Buiuçuzinho	Matrinxã	Nossa Senhora das Graças	Total	
Aac03	<i>A</i>	3	2	3	
	<i>P</i>	-	-	-	
	<i>Ho</i>	1,00	1,00	0,76	0,92
	<i>He</i>	0,52	0,50	0,66	0,56
Aac04	<i>A</i>	6	6	8	
	<i>P</i>	-	-	2	
	<i>Ho</i>	0,76	0,86	0,89	0,83
	<i>He</i>	0,75	0,78	0,80	0,77
Aac05	<i>A</i>	3	0	3	
	<i>P</i>	-	-	-	
	<i>Ho</i>	0,58	0,00	0,20	0,26
	<i>He</i>	0,44	0,00	0,18	0,20
Aac06	<i>A</i>	8	7	6	
	<i>P</i>	1	-	-	
	<i>Ho</i>	0,86	0,89	0,90	0,88
	<i>He</i>	0,76	0,73	0,81	0,76
Aac07	<i>A</i>	6	4	5	
	<i>P</i>	1	-	-	
	<i>Ho</i>	0,54	0,27	0,46	0,42
	<i>He</i>	0,72	0,68	0,53	0,64
Aac10	<i>A</i>	2	2	3	
	<i>P</i>	-	-	1	
	<i>Ho</i>	0,72	0,79	0,96	0,82
	<i>He</i>	0,47	0,48	0,52	0,49
Aac12	<i>A</i>	4	4	3	
	<i>P</i>	-	-	-	
	<i>Ho</i>	0,96	0,89	1,00	0,95
	<i>He</i>	0,66	0,66	0,62	0,64
Aac13	<i>A</i>	3	3	3	
	<i>P</i>	-	-	-	
	<i>Ho</i>	0,90	0,96	0,96	0,94
	<i>He</i>	0,59	0,59	0,60	0,59
Aac14	<i>A</i>	6	6	6	
	<i>P</i>	1	1	1	
	<i>Ho</i>	0,67	0,66	0,53	0,62
	<i>He</i>	0,70	0,75	0,49	0,64

Os altos índices de diversidade nas populações (Tabela 5) foram similares aos encontrados para outras palmeiras como *Bactris gasipaes* (COLE et al., 2007; HERNANDEZ, 2005; RODRIGUES et al., 2004), *Cocos nucifera* (PERERA et al. 2000), *Elaeis guineensis* e *E. oleifera* (BILLOTTE et al., 2001), *Euterpe edulis* (GAIOTTO et al., 2001), *Oenocarpus bacaba* (LEPSCH; CUNHA, 2003), *Phoenix dactlyfera* (ZEHDI et al., 2004), utilizando marcadores microssatélites.

5.3. Diversidade Genética entre e dentro das populações

A análise da variância molecular (AMOVA) revelou maior variabilidade genética dentro das populações 87,75% (intrapopulacional), e uma variabilidade menor entre as populações 12,25% (interpopulacional), resultado que corroboram com afirmações de autores como Hamrick (1983) Hamrick; Godt (1990); Kageyama; Gandara (1993); Kageyama et al. (2003), que afirmam que em plantas tropicais a distribuição da variabilidade é maior dentro das populações que entre populações (Tabela 6).

Resultados similares foram observados por Perera et al. (2001) para populações de coco do Sri Lanka, o qual demonstrou 98,5% de variação dentro das populações e por Rodrigues (2007) com pupunha que encontrou 83,7% de variação dentro das progênes.

A análise dos dados revelou um valor de diferenciação genética moderado ($F_{st}=0,12$) (Tabela 6). Este dado indica que, *A. jauari*, assim como outras espécies tropicais, apresenta altos níveis de diversidade intrapopulacional, com uma menor variação entre as populações. O valor de F_{st} reflete a ausência de fluxo gênico nos dias atuais, Cardoso et. al. (2000) encontrou para populações de *Euterpe edulis* um valor $F_{st}=0,42$, indicando um alto nível de diferenciação entre as populações.

Este padrão de distribuição está de acordo com o observado para as outras espécies arbóreas e com o esperado em espécies alógamas ou de sistema misto, com eficiente

mecanismo de dispersão de pólen e sementes (fluxo gênico). As habilidades dos indivíduos em trocar genes, associadas ao fluxo gênico entre populações, reduzem as diferenças entre as populações por deriva genética e seleção, reduzindo a diversidade genética entre populações (KAGEYAMA, 2003).

Tabela 6 – Resultado da análise de variância (AMOVA) das três populações de (*Astrocaryum jauari*) para todos os *loci* microssatélites estudados.

Fonte de variação	GL	SQ	Estimativa	Porcentagem	P
Interpopulacional	2	4,8611	0,0654	12,25	< 0,0001
Intrapopulacional	87	40,7495	0,4684	87,75	<0,0001
Total	89	45,6106	0,5338	100,0	
FST		0,1225			

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

5.4. Análise do Dendograma

Com base na similaridade genética média, calculada para os 90 indivíduos de *A. jauari* analisados, verifica-se no dendrograma (Figura 7) a formação de dois grupos, o primeiro formado pelas populações de Santa Luzia do Buiçuzinho e Matrixã e o segundo pela população de Nossa Senhora das Graças. Este resultado é sustentado por um alto valor do bootstrap (1.000 reamostragens).

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

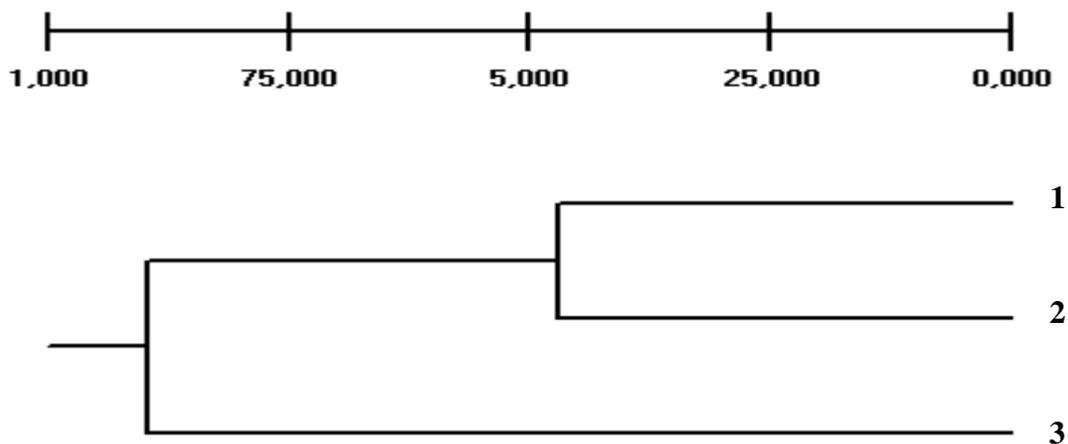


Figura 7 - Dendrograma de UPGMA das populações de *Astrocaryum jauari*, (1) população Santa Luzia do Buiuçuzinho, (2) Matrinxã e (3) Nossa Senhora das Graças, calculado de acordo com a identidade genética de Nei (1978). Os números descritos nos ramos foram obtidos para teste de bootstrap após 1.000 reamostragens.

A matriz de distância genética (Nei 1978) foi utilizada para estabelecer o nível de divergência genética entre as populações (Tabela 7). As estimativas de distância genética utilizando dados de SSR variou de 0,0732 para as populações mais relacionadas (Santa Luzia do Buiuçuzinho e Matrinxã), a 0,1397 para as populações mais distantes (Santa Luzia do Buiuçuzinho e Nossa Senhora das Graças).

Tabela 7: Matriz de distância genética entre as 3 populações de *Astrocaryum jauari*, sendo 1 população Santa Luzia do Buiuçzinho, 2 População Matrinxã e 3 População Nossa Senhora das Graças.

Populações	1	2	3
1	*****		
2	0,0732	*****	
3	0,1397	0,0896	*****

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível observar que populações próximas geograficamente são relacionadas do ponto de vista genético. É possível que o padrão observado para esta espécie esteja relacionado com a sua biologia reprodutiva, que apresentam principalmente dispersão de pólen por insetos pesados e de sementes por zoocoria e hidrocória. Segundo Bawa (1999) é difícil prever padrões de fluxo gênico em espécies tropicais devido ao comportamento imprevisível do agente dispersor.

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que embora grande parte da variação genética da espécie esteja a nível intrapopulacional, há uma sensível diferenciação genética entre populações de jauari. Planos de manejo e conservação de *A. jauari* devem observar a variabilidade genética encontrada nessas populações, visando garantir a preservação de recursos genéticos desta espécie. Para que se garanta que a grande parte da variabilidade seja preservada, populações de cada um dos dois grupos dessas regiões devem ser conservadas.

O padrão de variabilidade genética encontrado em jauari é o mesmo de espécies tropicais alógamas. Para a conservação deste tipo de espécie é necessário uma amostragem representativa do conjunto de genes contidos nos indivíduos de cada população, o que pode resultar em um elevado número de indivíduos a compor uma coleção *ex situ*. As coleções estabelecidas em campo demandam recursos permanentes para a manutenção. A experiência com a conservação em campo de espécies perenes nativas da região amazônica mostra que se deve fomentar a conservação participativa *in situ* de jauari nas áreas em que esta espécie é

utilizada pelas populações, como nas comunidades tradicionais. Com a conservação *in situ*, os esforços e recursos poderão ser concentrados em coleções de trabalho de pequena dimensão, incluindo apenas os genótipos de maior potencial, selecionados *in situ*, e que poderão, já no primeiro ciclo de seleção, constituir os primeiros campos de produção de sementes para os plantios.

6. CONCLUSÕES

O protocolo CTAB 2% modificado foi eficiente na extração de DNA de Jauari (*A. jauari* Mart.) propiciando um DNA de qualidade adequada ao uso na técnica de microssatélites.

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

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

REFERÊNCIAS

BARRAT-SEGRETAIN, M. H. 1996. Strategies of reproduction, dispersion and competition in river plants: a review. **Vegetation**, v. 123, p. 13-37.

BATISTA, J. S. 2010. **Caracterização genética da dourada *Brachyplatystoma rousseauxii*, Castelnau, 1855 (Siluriformes: Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites: subsídios para conservação e manejo.** Tese. Doutorado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva. Programa de Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva/INPA. Manaus. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

BAWA, K. S. 1999. Plant-pollinator interactions in Tropical rain forests. Annu. **Rev. Ecol. Systematics**, v. 21, p. 399-422.

BERNARDES, L. G. 2008. **Diversidade genética de tucumanzeiro (*Astrocaryum aculeatum* Mart.) com marcadores microssatélites.** Dissertação. Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais. PPGCIFA/UFAM. Manaus. Universidade Federal do Amazonas.

BILLOTE, N.; RISTERUCCI, A.M.; BARCELOS, E.; NOYER, J.L.; AMBLARD, P.; BAURENS, F.C. 2001. Development, characterization, and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) microsatellite markers. **Genome**, v.44, n.3, p.413-425.

BONDAR, G. 1964. **Palmeiras do Brasil.** Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo. *Instituto de Botânica*. Boletim nº 2. p 159.

BUSO, G. S. C., et al. 2003 Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. Brasília: Embrapa, DF – Brasil. Setembro, 11 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 20).

CARDOSO, S. R. S.; ELOY, N. B.; PROVAN, J.; CARDOSO, M. A.; FERREIRA, P.C.G. 2000. Genetic Differentiation of *Euterpe edulis* Mart. Populations estimated by AFLP Analysis. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1753-1760.

CLEMENT, C.R; MÜLLER, C.H.; FLORES, W.B.C. 1982. Recursos genéticos de espécies frutíferas da Amazônia Brasileira. **Acta Amazônica**, Manaus, v.12, n. 4, p.677-695.

CLEMENT, C. R.; SOUZA, N. R.; RODRIGUES, D. P.; ASTOLFI-FILHO, S.; MORENO, Y. N.; PASCUAL, V. T.; RODRÍGUEZ, F. J. G.. 2002. Use of AFLPs to distinguish

landraces of Pajibaye (*Bactris gasipaes*) in Brazilian Amazonia. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 4, p. 749-753.

CLEMENT, C.R.; LLERAS PÉREZ, E.; VAN LEEUWEN, J. 2005. O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. **Agrociências**, v.9, n.1-2, p.67-71.

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

CONDIT, R.; HUBBELL, S.P. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. **Genome**, v. 34, p. 746-757.

CRUZ, C.D. 2006. **Programa Genes: análise multivariada e simulação**. Viçosa: UFV. 175p.

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

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

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

FRAXE, T.J.P.; PEREIRA, H.S.; WITKOSKI, A.C. 2007. **Comunidades Ribeirinhas Amazônicas: Modos de Vida e Uso dos Recursos Naturais**. 1. ed. Manaus: EDUA, 224 p.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.R.; BRISCOE, D.A. 2002. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge University Press. Cambridge, England. 640 p.

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

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

GOUDET, J. 2001. **FSTAT**: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995).

GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, Netherlands. v. 113, p. 163-185.

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

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

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

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. 1995. **Field guide to the palms of the Americas**. Princeton University Press. New Jersey. 353 p.

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

HOELZEL, A. 1998. Genetic structure of cetacean populations in sympatry, parapatry, and mixed assemblages: implications for conservation policy. **J Hered**, 89: 451-458.

JEFREYS, A.J.; TAMAKI, K.; MACLEOD, A.; MONCKTON, D.G.; NEIL, D.L.; ARMOUR, J.A. 1994. Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites. **Nature Genetics**, 6: 136-145.

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B. 1993. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: implicações para manejo e a conservação. **In: Simpósio de Ecossistemas da Costa**

Brasileira, 3, Serra Negra. Anais. São Paulo: Academia de Ciências do Estado de São Paulo, p.1-4.

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

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

LEPSCH-CUNHA, N.; LUND, C. A.; HAMILTON, M. B. 2003. Isolation and characterization of nuclear microsatellite loci in the tropical arboreal palm *Oenocarpus bacaba* (Arecaceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 3,p.435-437.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G.A. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanisms for DNA sequense evolution. **Molecular Biology and Evolution**, 4: 203-221.

LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, 11: 2453-2465.

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; FIGUEIRA, A.V.O.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C.; CARNEIRO, M.S. 2003. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP): aspectos técnicos e interpretação genética. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 64-68.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; COSTA, J. T.M.; CERQUEIRA, L.S.C.; FERREIRA, F. 2004. **Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum.

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

MILACH, S. 1998. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Sandra Milach, 141p.

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

MIRANDA, I. P. A.; RABELO, A. 2006. Guia de identificação das palmeiras de um fragmento florestal. EDUA, 230p.

MOBOT. Missouri Botanical Garden. Disponível em:<
<http://www.tropicos.org/Name/2400784>. Acesso em: 07/06/2011.

NEI, M.; LI, W. 1978. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences from the USA**, v.76, p.5269-5273.

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

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

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

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

PIEIDADE, M.T.F. 1985. **Ecologia e biologia reprodutiva de *Astrocaryum jauari* Mart. (Palmae) como exemplo de população adaptada às áreas inundáveis do Rio Negro (igapós)**. Dissertação. Mestrado em ciências biológicas. PPGBTRN/INPA/UA. Manaus: Universidade do Amazonas.

PIEIDADE, M. T.F.; PAROLIN, P. e JUNK, W. J. 2003. Estratégias de dispersão, produção de frutos e extrativismo da palmeira *Astrocaryum jauari* Mart. nos igapós do rio negro: implicações para a ictiofauna. **Ecologia Aplicada**, 2(1).

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

POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, v.1, n.7, p.215-222.

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

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

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

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

ROSE, O.; FALUSH, D. 1998. A threshold size for microsatellite expansion. **Mol. Biol. Evol.**, 15: 613–615.

SCHLÖTTERER, C. 2000. Microsatellite analysis indicates genetic differentiation of the neo-sex chromosomes in *Drosophila americana americana*. **Heredity**, 85: 610-616.

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

SELKOE, K.A.; TOONEN, R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, 9: 615-629.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. 2005. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 640 p.

SPRUELL, P.; HEMMINGSEN, A.R.; HOWELL, P.J.; KANDA, N.; ALLENDORF, F.W. 2003. Conservation genetics of bull trout: Geographic distribution of variation at microsatellite *loci*. **Conservation Genetics**, 4: 17-19.

USDA, ARS. National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources Information Network - (GRIN)* [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Disponível em: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?5934>. Acesso em: 07/06/2011.

WANG, Z.; WEBER, J.L.; ZHONG, G. TANKSLEY, S.D. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical Applied Genetics**, v.88, p.1-6.

ZIMBACK, L.; MORI, E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; VEIGA, R.F.A.; MELLO JUNIOR, J.R.S.M. 2004. Genetic structure of *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) populations by RAPD markers. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.65, p.114-119

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

ZHU, Y.; STRASSMANN, J.E.; QUELLER, D.C. 2000. Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. **Genetics Research**, 76: 227-236.

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. P. V. ; PINHEIRO, J. B.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; VENCOVSKY, R. 2003. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.4, p. 449-457.