



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

**DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE
POPULAÇÕES DE *Astrocaryum acaule* Mart. (ARECACEAE)**

ALINE ARAÚJO PATRÍCIO LIMA

MANAUS
2017

ALINE ARAÚJO PATRÍCIO LIMA

**DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE
POPULAÇÕES DE *Astrocaryum acaule* Mart. (ARECACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Florestais e Ambientais.

Orientadora: Dra. Maria Teresa Gomes Lopes

Coorientador: Dr. Magno Sávio Ferreira Valente

Dr. Santiago Linório Ferreyra Ramos

MANAUS
2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Lima, Aline Araújo Patrício
L732d Diversidade genética entre e dentro de populações de
 Astrocaryum acaule Mart. (Arecaceae) / Aline Araújo Patrício Lima.
 2017
 58 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Teresa Gomes Lopes
Coorientador: Magno Sávio Ferreira Valente
Coorientador: Santiago Linório Ferreyra Ramos
Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Variabilidade genética. 2. marcador molecular. 3. palmeira. 4.
AFLP. I. Lopes, Maria Teresa Gomes II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Faculdade de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Florestais e Ambientais - PPGCIFA



PARECER
Defesa nº 193

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais, da Faculdade de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Amazonas, após arguir da mestrandia **ALINE ARAÚJO PATRÍCIO LIMA**, em relação ao seu trabalho de dissertação intitulada "**DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE POPULAÇÕES DE *Astrocaryum acaule* Mart. (ARECACEAE)**" é de parecer favorável à aprovação da mestrandia habilitando-a ao título de Mestre "*Magister Scientiae*" em Ciências Florestais e Ambientais, na área de concentração em **CIÊNCIAS FLORESTAIS E AMBIENTAIS (CIFA)**.

Professora Doutora Maria Teresa Gomes Lopes
Universidade Federal do Amazonas - UFAM
Presidente

Professor Doutor Pedro de Queiroz Costa Neto
Universidade Federal do Amazonas - UFAM
Primeiro Examinador

Pesquisadora Doutora Lucia Helena Pinheiro Martins
Universidade Federal do Amazonas - UFAM-NUSEC
Segunda Examinadora

Manaus, 21 de julho de 2017

Prof. Dr. Marciel José Ferreira
Coordenador do Programa de Pós Graduação em
Ciências Florestais e Ambientais - PPG-CIFA



Dedicatória

Dedico a toda minha família,
especialmente meus pais,
Francisca e Geraldo (*In memorian*)

AGRADECIMENTOS

À Jeová Deus pela vida e por ser a fonte de toda sabedoria e conhecimento.

À minha família, em especial minha mãe Francisca Ferreira de Araújo, ao meu pai Geraldo dos Santos Patrício (*in memorian*), aos meus irmãos e também ao meu marido.

À Universidade Federal do Amazonas em especial ao programa de Pós-graduação em Ciências Florestais e Ambientais (PPG-CIFA).

À CAPES por conceder a bolsa de pesquisa para a realização deste trabalho.

À professora Dr^a. Maria Teresa Gomes Lopes pela orientação e compreensão.

Ao Pesquisador Dr. Magno Sávio Ferreira Valente pelo apoio, amizade e auxílio nas análises estatísticas.

Ao Pesquisador Santiago Linorio Ferreyra Ramos, pelo auxílio nas coletas.

Ao querido professor Pedro Queiroz, pelo incentivo e ensinamentos.

Ao amigo Mozanil por toda a ajuda nas atividades de laboratório.

À professora Maria Gracimar Pacheco Oliveira, pelas informações repassadas sobre a espécie de estudo.

Ao colega Marcos Melo Corrêa, pelo auxílio nas coletas de material botânico.

Aos amigos do Laboratório de Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias.

Aos amigos do Laboratório Bioativos da Faculdade de Ciências Agrárias.

À todos que contribuíram de alguma forma para este trabalho.

AGRADEÇO

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Astrocaryum acaule</i> : a) espata com frutos; b) planta inteira; c) fruto isolado..	20
Figura 2. Fruto, folhas e espinhos.....	22
Figura 3. <i>Astrocaryum acaule</i> em uma comunidade na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé.....	22
Figura 4. Mapa de localização das populações de <i>Astrocaryum acaule</i> amostradas....	29
Figura 5. Dendrograma gerado pelo programa MEGA7, com base no complemento aritmético da distância genética de Jaccard e método de agrupamento UPGMA em 90 subamostras de <i>Astrocaryum acaule</i> prospectadas em área da UFAM (círculo amarelo), Tupé (quadrado vermelho) e Tarumã-Açu (triângulo verde). Coeficiente de correlação cofenética $r = 0,9011$	40
Figura 6. Análise de escalonamento multidimensional não-métrico das distâncias genéticas entre 90 subamostras de <i>Astrocaryum acaule</i> prospectadas em três populações.....	42
Figura 7. Estrutura populacional empregando o programa <i>Structure</i> a partir de 90 subamostras de <i>Astrocaryum acaule</i> prospectadas de três populações, considerando diferentes números de agrupamentos (K).....	43
Figura 8. Análise de agrupamento UPGMA a partir da distância genética de Nei (1972), para três populações de <i>Astrocaryum acaule</i> . Coeficiente de correlação cofenética: $r = 0,9954$	44
Figura 9. Teste de mantel (distância geográfica vs distância genética), $r = 0,4076$ e Nível de significância (P) = 0,001. Linha em vermelho representa a regressão linear entre distância espacial x dissimilaridade.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sítios das enzimas de restrição e sequências de adaptadores usados no estudo.....	32
Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos usados para as análises de polimorfismo de comprimentos de fragmentos amplificados.....	33
Tabela 3. Polimorfismo obtido em subamostras de <i>Astrocaryum acaule</i> a partir de três combinações de oligonucleotídeos utilizando marcadores AFLP.....	39
Tabela 4. Agrupamento de 90 subamostras de <i>Astrocaryum acaule</i> pelo método de otimização de Tocher, baseado na matriz de distância genética obtida pelo complemento aritmético do índice de Jaccard.....	41
Tabela 5. Diversidade genética dentro de populações de <i>Astrocaryum acaule</i> e em nível de espécie.....	46
Tabela 6. Variação genética obtida pela Análise de Variância Molecular – AMOVA entre e dentro de populações naturais de <i>Astrocaryum acaule</i>	47

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1 Família Arecaceae	17
3.1.1 <i>Astrocaryum acaule</i> Mart.	19
3.2 Variabilidade genética.....	23
3.3 Marcadores moleculares	24
3.3.1 Marcadores AFLP	25
5 MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1 Área de estudo	28
5.2 Extração e quantificação de DNA	29
5.3 Desenvolvimento de marcadores AFLP	31
5.3.1 Digestão de DNA	31
5.3.2 Preparo e ligação dos adaptadores	31
5.3.3 Reações de amplificação	32
5.3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida	33

5.3.6 Revelação do gel	34
5.4 Análises de diversidade e estrutura genética.....	35
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6.1 Extração e quantificação de DNA	38
6.2 Seleção de <i>primers</i>	38
6.3 Diversidade entre indivíduos	38
6.4 Diversidade entre populações.....	43
6.5 Diversidade dentro de populações.....	46
6.6 Diversidade entre e dentro de populações.....	47
7 CONCLUSÕES	49
8 REFERÊNCIAS.....	50
ANEXO	57

RESUMO

Astrocaryum acaule Mart. (Arecaceae) possui frutos comestíveis, a semente da planta é utilizada para a fabricação de biojóias e as folhas para extração de fibras. Com o caule subterrâneo, esta espécie tem sido visada no melhoramento interespecífico com *A. aculeatum* para a redução do porte dessa importante fruteira da Amazônia. O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade genética entre e dentro de populações de *A. acaule* por meio de marcadores AFLP. Foram estudadas três populações localizadas na cidade de Manaus. Em cada população foram coletadas aleatoriamente amostras foliares de 30 plantas. Três combinações de *primers* AFLP foram analisadas nas populações: E+ACA/M+CGC, E+AAC/M+CAC e E+AAC/M+CGA e estimada a porcentagem de locos polimórficos. A partir dos dados binários obtidos das genotipagens foi realizada análise de variância molecular, construído o dendrograma e verificado os padrões genéticos de diferenciação e subestruturação populacional. Dos 200 locos revelados, 198 (99%) foram polimórficos. O dendrograma gerado com base no complemento aritmético da distância genética de Jaccard e método de agrupamento UPGMA das 90 subamostras de *A. acaule* revelou que os indivíduos da população do Tarumã-Açu se destacam como sendo geneticamente diferentes das outras duas populações, UFAM e Tupé e o dendrograma obtido com base na distância genética de Nei confirmou esta informação. Os valores da heterozigosidade esperada (H_e) e o índice de diversidade genética de Shannon e Weaver (I) não apresentaram grandes variações entre as três populações. Contudo, os maiores valores de H_e (0,2169) e I (0,3413) foram encontrados na população Tarumã-Açu, indicando maior diversidade genética dentro desta população. O resultado da Análise Molecular de Variância atribuiu 25,42% e 74,58% da variação entre e dentro das populações, respectivamente. Assim, planos de uso e conservação da espécie devem observar a variabilidade genética encontrada nessas populações, visando garantir a conservação de seus recursos genéticos. Os marcadores moleculares do tipo AFLP revelam alto conteúdo de informação genética em *A. acaule* e podem ser utilizados para análises genéticas, visando obter informações para a sustentabilidade genética e manejo da espécie. A distribuição da diversidade genética nas populações estudadas de *A. acaule* é maior dentro das populações que entre elas, sendo necessário obter amostras representativas de cada um dos grupos geneticamente distintos para a conservação genética das populações estudadas.

Palavras-chave: Variabilidade genética, marcador molecular, palmeira, AFLP.

ABSTRACT

Astrocaryum acaule Mart. (Arecaceae) has edible fruits, the seed is used for the manufacture of biojóias, the leaves for fiber extraction. With the subterranean stem, this species can be targeted in the interspecific improvement with *A. aculeatum* to reduce the size of this important palm of the Amazon. The objective of this study was to evaluate the genetic diversity among and within populations of *A. acaule* by means of AFLP markers. The three populations studied were located in the city of Manaus, and samples of 30 plants were collected from each population. Three primer combinations were selected for the analysis: E + ACA / M + CGC, E + AAC / M + CAC and E + AAC / M + CGA. The percent of polymorphics locis was estimated, Analysis of Molecular Variance performed, dendrogram builded and the populational differentiation and substructuration genetics patterns checked. The dendrogram generated on the basis of the arithmetic complement of the Jaccard genetic distance and the UPGMA grouping method of the 90 subsamples of *A. acaule* revealed that the individuals in the Tarumã-Açu population stand out as being genetically different from the other two populations, UFAM and Tupé, and the Dendrogram obtained based on the genetic distance of Nei confirms this information. The values of expected heterozygosity (H_e) and the genetic diversity index of Shannon and Weaver (I) did not show large variations among the three populations. However, the highest values of H_e (0.2169) and I (0.3413) were found in the Tarumã-Açu population, indicating greater genetic diversity within this population. These results were already expected, as this population is more propitious to receive genetic material from other regions and, therefore, the individuals that compose it have greater genetic variability. The result of the Molecular Analysis of Variance attributed 25.42% and 74.58% of the variation between and within the populations, respectively. Thus, plans of use and conservation of the species must observe the genetic variability found in these populations, in order to guarantee the conservation of their genetic resources. Molecular markers of the AFLP type reveal high content of genetic information in *A. acaule* and can be used for genetic analysis, aiming to obtain information for genetic sustainability and species management. The distribution of genetic diversity in the studied populations of *A. acaule* is greater within the populations than among them, and it is necessary to obtain representative samples of each of the genetically distinct groups for the genetic conservation of the species.

Key-Words: Genetic variability, molecular marker, palm, AFLP.

1 INTRODUÇÃO

A região Amazônica é rica em diversidade animal e vegetal. Dentre os grupos vegetais, destacam-se as palmeiras, espécies da família Arecaceae. As palmeiras possuem finalidades variadas para o homem, com uso na alimentação, construções e geram subprodutos que são fonte de renda para a sobrevivência de populações amazônicas (BALICK E BECK, 1990; WALLACE, 2014). As palmeiras nativas da Amazônia, embora com grande potencial para o desenvolvimento da região, encontram-se, em grande parte, na condição silvestre ou semi-silvestre (GOMES, 2009), a exemplo da palmeira *Astrocaryum acaule* Mart. (tucumã), espécie ainda negligenciada em estudos que permitam o seu melhor aproveitamento.

Astrocaryum acaule possui frutos comestíveis, mas com tamanho reduzido comparado a *Astrocaryum aculeatum* (tucumã-do-Amazonas), além disso, a semente é utilizada para a fabricação de biojóias, sendo uma das espécies utilizadas com maior frequência para produção de anéis na região Amazônica. As folhas são utilizadas para extração de fibras e estas possuem propriedades físicas, químicas e organolépticas adequadas para a produção de tecidos naturais (MACIEL et al., 2008; PACHECO et al., 2011).

A espécie possui uma característica bem interessante, o caule subterrâneo, facilitando a coleta dos frutos e das folhas, já que as folhas saem diretamente do solo e o pedúnculo da espádice com os frutos cresce entre as folhas (WALLACE, 2014). A espécie possui porte muito baixo, e pode ser visada no melhoramento interespecífico com *A. aculeatum* para a redução de porte dessa importante frutífera da Amazônia.

O desmatamento na Amazônia, seja pelo extrativismo ou para uso agropecuário, vem reduzindo a variabilidade genética de muitas espécies arbóreas (KOSKELA e AMARAL, 2002), entre elas, as palmeiras amazônicas. Acredita-se que essa perda de variabilidade genética é causada pelos efeitos de deriva genética, de endogamia relacionada à redução do tamanho de suas populações e pela diminuição ou perda de fluxo gênico entre populações anteriormente conectadas (ELLSTRAND e ELAM, 1993; KOSKELA e AMARAL, 2002).

Diante dos relatos de mudanças climáticas globais, a manutenção da variabilidade genética tornou-se um fator primordial para as espécies manterem sua capacidade de reagir a tais mudanças, que podem gerar estresses ambientais (CRUZ et al., 2011). É necessário o conhecimento da quantificação e distribuição da diversidade genética entre e dentro de uma população para delinear estratégias de uso e conservação das diferentes espécies vegetais visando enfrentar também os desafios das mudanças climáticas.

Estudos da variabilidade genética em populações naturais de palmeiras em regiões tropicais demonstram que estas preservam grande variabilidade dentro das populações, comparando-se com as existentes em outros ambientes, a exemplo das palmeiras *Mauritia flexuosa* (GOMES et al., 2011), *A. aculeatum* (RAMOS et al., 2012) e *Astrocaryum jauari* (OLIVEIRA et al., 2014), *Butia capitata* (BUTTOW et al., 2010) e *Euterpe edulis* (CARDOSO et al., 2000). A distribuição da variabilidade genética natural é influenciada por fatores como o modo de reprodução das espécies, sistema de cruzamento, tamanho efetivo da população, distribuição geográfica e fluxo gênico (PAIVA, 1998).

A partir do conhecimento da diversidade genética entre e dentro de populações naturais é possível entender como a seleção está atuando em função da adaptabilidade e estabelecer estratégias de conservação, pois quanto maior a variabilidade genética existente na população, maior é a chance de perpetuação da espécie (ESTOPA et al., 2006). Gomes et al. (2011) realizaram estudos do padrão de distribuição da variabilidade genética de buritizeiro e recomendaram a conservação *in situ* desta palmeira devido a necessidade de realizar uma amostragem representativa do conjunto de genes contidos nos indivíduos das populações analisadas. Os autores recomendaram fomentar a conservação participativa *in situ* de buritizeiro nas áreas em que esta espécie é utilizada pelas populações humanas, como nas comunidades tradicionais amazônicas, assim, os esforços e recursos para a espécie poderão ser concentrados em coleções de trabalho de pequena dimensão, incluindo apenas os genótipos de maior potencial, selecionados *in situ*. Ao investigar a distribuição da variabilidade genética de outras palmeiras, a exemplo de *A. acaule*, será possível também planejar estratégias de conservação como realizado para buritizeiro.

Existem várias técnicas para realização de estudos de diversidade genética, entre estas, os marcadores moleculares possibilitam a identificação de locos polimórficos no DNA e não são influenciados pelos efeitos ambientais. A técnica AFLP (*Amplified Fragment Length Polimorfism*) se distingue de outras, pois detecta grande número de locos com ampla cobertura do genoma, bem como pode ser utilizada em estudos com espécies de pouco ou nenhum conhecimento molecular prévio (LOPES et al., 2003; FALEIRO, 2007). Marcadores moleculares do tipo AFLP, foram utilizados neste estudo, em populações de *A. acaule* para qual o conhecimento da organização da variabilidade genética das populações naturais é fundamental para uso, conservação e melhoramento genético.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a variabilidade genética entre e dentro de populações naturais de *Astrocaryum acaule*.

2.2 Objetivos Específicos

Otimizar um protocolo de extração de DNA para *A. acaule*.

Identificar combinações de *primers* AFLP com boa qualidade de amplificação e maior polimorfismo para analisar a diversidade genética da espécie estudada.

Caracterizar a diversidade genética entre e dentro das populações de *A. acaule*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Família Arecaceae

As palmeiras são plantas pertencentes à família Arecaceae, constituída por aproximadamente 1.500 espécies e 200 gêneros no mundo. No Brasil, ocorrem aproximadamente 39 gêneros e 264 espécies de palmeiras nativas (LEITMAN et al., 2013; LOPES et al., 2015). Na Amazônia, estimou-se a ocorrência de 34 gêneros e 134 espécies, assim, o que caracteriza a Amazônia não é a riqueza de espécies de palmeiras, mas a abundância (HENDERSON, 1995).

As palmeiras são numerosas em espécies e em tipos biológicos, e são consideradas ótimos marcadores ecológicos, pois, desempenham um papel destacado no funcionamento dos ecossistemas florestais (KAHN e MOUSSA, 1994). São ainda, abundantes, produtivas, e foram muito importantes na subsistência de povos indígenas, algumas ainda são importantes para a sobrevivência 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 silvestre ou semi-silvestre e não existem sementes melhoradas e nem sistemas de produção recomendados para o plantio.

O gênero *Astrocaryum* possui 24 espécies nativas na Amazônia, sendo o terceiro gênero mais diversificado depois de *Geonoma* e *Bactris*. Apresenta hábitos diversos com espécies acaules, com caule fino, grosso, alto, baixo, solitário ou cespitoso com muitos espinhos (BARBOSA et al., 2005).

A distribuição das palmeiras e a composição de suas comunidades são afetadas pela topografia em escalas local e de paisagem, provavelmente em decorrência dos efeitos que a topografia exerce sobre a hidrologia, a dinâmica da floresta e solos (EISERHARDT et al., 2011). Embora os efeitos de fatores hidrológicos – na distribuição das palmeiras - ainda não estejam bem definidos, sabe-se que, pelo menos na Amazônia a diversidade de palmeiras em áreas úmidas é menor que em florestas inundadas.

Nas florestas úmidas, as palmeiras estão entre os principais componentes do dossel e são elementos muito vistos no sub-bosque. São recursos disponíveis o ano

todo (PERES, 1994; HENDERSON et al., 2000) e têm conteúdo nutritivo, caracterizando-se como fundamentais para as comunidades de animais frugívoros e polinizadores, principalmente nos períodos de escassez de alimentos (TERBORGH, 1986; ZONA e HENDERSON, 1989). Para algumas espécies da fauna, as palmeiras são os principais itens da dieta alimentar (DOMINY et al., 2003).

Além das gramíneas (Poaceae) e leguminosas (Leguminosae), as palmeiras formam o grupo mais importante de plantas úteis ao ser humano, sendo muito utilizados nos trópicos por populações rurais e indígenas (BALICK, 1984; JOHNSON, 2010). São amplamente utilizadas na alimentação, em construção e na fabricação de utensílios domésticos e ornamentos (BALICK, 1984; SULLIVAN et al., 1995; JOHNSON, 2010). A grande variedade de produtos feitos a partir de palmeiras e o uso destes por humanos caracterizam esta família botânica como uma das mais importantes fontes de produtos florestais não madeireiros (LOPES et al., 2015).

Nos trópicos, as populações humanas dependem muito de produtos das palmeiras para sua sobrevivência (JOHNSON, 2010) e geração de renda, sendo impressionante a diversidade de aproveitamento de produtos derivados dessas plantas por essas populações rurais (MACÍA et al., 2011). Esse aproveitamento envolve, praticamente, todas as partes das palmeiras (BALSLEV, BARFOD, 1987; BALSLEV et al., 2010). Embora o uso seja intenso e diversificado apenas algumas espécies são consideradas domesticadas (LOPES et al., 2015).

As palmeiras presentes na Amazônia caracterizam-se por produzir frutos apreciados como a pupunha (*Bactris gasipaes*), buriti (*M. flexuosa*), tucumã (*A. aculeatum*), coco (*Cocos nucifera*), açaí (*E. oleracea* e *E. precatoria*) assim como frutos com grande potencial econômico, mas ainda pouco manejados, como urucuri (*Attalea* spp.), inajá (*Maximiliana maripa*), jauari (*A. jauari*) e o tucumã (*A. acaule* Mart.).

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 e RABELO, 2006).

3.1.1 *Astrocaryum acaule* Mart.

A espécie *A. acaule* apresenta a classificação taxonômica: reino Plantae (Vegetal), divisão Magnoliophyta (Angiospermae), subdivisão Liliopsida, classe Monocotyledoneae, família Arecaceae, subfamília Arecoideae, tribo Cocoeae, subgênero Bactridinae e gênero *Astrocaryum* (KAHN, 2008).

O nome popular de *A. acaule* no Brasil é tucumã, além de mumu nas tribos Wayana, na Colômbia possui nomes como cocorito, espina, tucum, mataukuri para os povos Piapoco e na Venezuela é conhecido como corozo (SMITH, 2015). *A. acaule* é uma palmeira solitária com tronco subterrâneo (Figura 1).

Possui de cinco a seis folhas grandes, em coroa, e arranjo espiral e ereto. O pecíolo da folha possui 30 cm de comprimento. A bainha da folha é fibrosa, adaxial e abaxialmente arredondado. A raque da folha possui de 140 a 193 cm de comprimento, de 49 a 52 pares de pinas, que são distribuídos em grupos de um a três ao longo da raque, em vários planos. Possui até três flores pistiladas na parte basal e flores estaminadas na porção distal. As flores pistiladas são trímeras, gamossépalas, gamopétalas, com cálice e corola cupular, corola apresentando um anel estaminodial conato na base, ovário tricarpetal, trilocular, uniovulado (BARBOSA et al., 2005).

As flores estaminadas são trímeras, gamossépalas, as pétalas são levemente soldadas na base, possuem aproximadamente seis estames, as anteras são rimosas, dorsifixas, com pistilódio trifido no centro. A inflorescência possui estames e pistilos, apresenta tamanho de aproximadamente 50 cm de comprimento e o pedúnculo apresenta comprimento de 13 cm.

A bráctea peduncular inclui um bico de 3 cm e a parte expandida mede aproximadamente 36 centímetros de comprimento por 4,5 cm de largura, perímetro de 7,5 cm e espessura de 2 mm. Os frutos apresentam coloração verde-amarelado, com 3,5 cm de comprimento e 3,8 cm de diâmetro (FAIRCHILD TROPICAL GARDEN, 1994; BARBOSA et al., 2005).

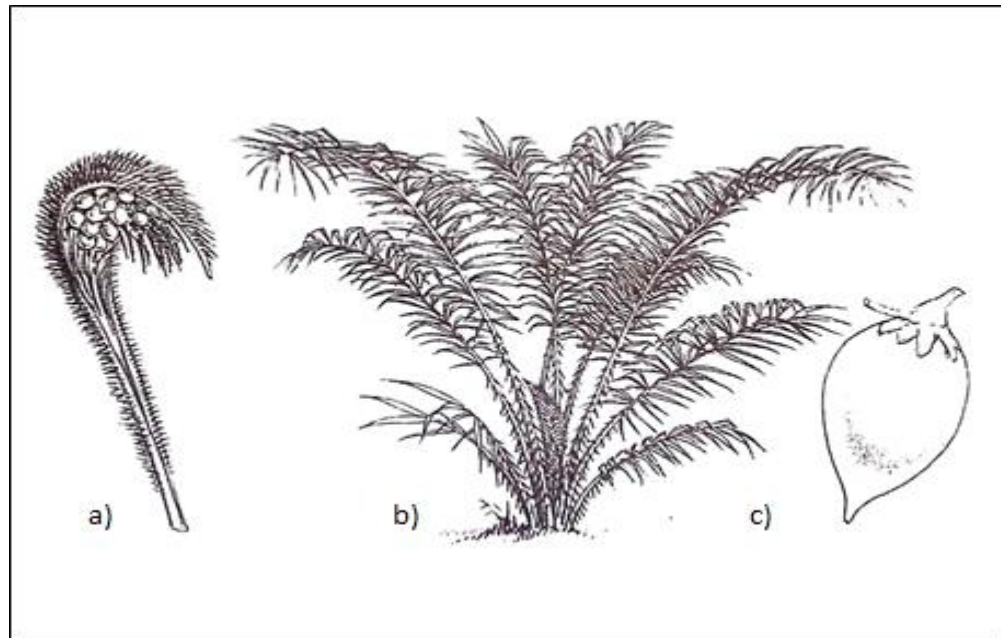


Figura 1. *Astrocaryum acaule*: a) espata com frutos; b) planta inteira; c) fruto isolado Fonte: Wallace (2014)

A. acaule está distribuído pela parte central do Norte da bacia Amazônica (KAHN e MILLÁN, 1992). A ocorrência da espécie foi registrada na Amazônia colombiana, Venezuela, Guiana e Brasil (Estados do Amazonas, Pará e Rondônia) (HENDERSON et al., 1995). A distribuição geográfica está concentrada, em grande parte, no Estado do Amazonas, principalmente na área pertencente ao Alto Rio Negro (MACIEL, 2008).

A ocorrência da espécie foi relatada na região do Rio Negro, baixios de floresta tropical úmida, bancos de areia, ilhas fluviais, floresta marginal de savana, afloramentos rochosos, margens de estradas ou outras áreas perturbadas, principalmente em solos arenosos. Em condições favoráveis, como as indicadas anteriormente, a espécie se espalha abundantemente, mas em florestas primárias onde não ocorreu nenhum tipo de perturbação, ela é incomum (HENDERSON et al., 1995). *A. acaule* ocorre em alta densidade nas florestas estabelecidas sobre solos arenosos alagados (KAHN e MILLÁN, 1992).

A ocorrência da espécie também foi registrada em áreas abertas ou perturbadas sobre solo seco e areno-argiloso, além de margens de riachos sobre solo úmido e arenoso (KÜCHMEISTER et al., 1998). De modo geral, a espécie está presente em matas alagáveis, beiras de rios e igarapés especialmente em terrenos arenosos, em

áreas com alguma interferência antrópica, não sendo encontrada no interior da floresta densa. É particularmente frequente na região do Alto Rio Negro, Estado do Amazonas (LORENZI et al., 2004).

A ocorrência também foi descrita em relação a rios de águas negras e claras (barrentas). *A. acaule* habita florestas ao longo dos cursos de água preta, como o Rio Negro e muitos de seus afluentes, assim como o Rio Urubu que desemboca no Médio Rio Amazonas. Mas, também ocorre ao longo das costas arenosas de rios de águas claras, como o Rio Tapajós (SMITH, 2015).

A flor de *A. acaule* emite odor intensificado pela termogênese e atrai insetos visitantes. As inflorescências são bissexuais ou monóicas, e esta espécie apresenta protoginia. A emissão de odor é acompanhada de aumento da temperatura das inflorescências. Os insetos visitam as flores com a abertura da espata. Dentre os insetos observados visitando *A. acaule*, destacam-se os besouros (Coleóptera), abelhas (Hymenoptera) e moscas (Díptera). Os principais polinizadores são abelhas e besouros. As abelhas coletaram o pólen principalmente no final da tarde, e os escarabeídeos iniciam as visitas ao anoitecer, e conforme a temperatura das flores se eleva, as visitas dos coleópteros se intensificam, durante o dia, eles ficam escondidos na inflorescência e ao anoitecer eles começam a andar sobre as flores novamente (KÜCHMEISTER et al., 1998).

Os insetos participam da biologia reprodutiva da planta, buscando pólen, proteção e abrigo para a reprodução (KÜCHMEISTER et al., 1998; ARAÚJO e STORTI, 2008). Segundo Lorenzi et al. (2004), os frutos são muito apreciados pela fauna, especialmente pequenos roedores.

O fruto amarelo (Figura 2), medindo quatro centímetros de comprimento por três centímetros de largura, contém uma camada rica em vitamina A. A semente é usada para esculpir anéis e outros ornamentos para o comércio de artesanato (SMITH, 2015).

As fibras das folhas de *A. acaule* são utilizadas na confecção de produtos artesanais como: bolsas, calçados, esteiras, tapetes, redes, colares, pulseiras, chapéus, entre outros (SOUZA et al., 2004). A espécie possui folhas grandes de coloração em tom verde escuro (Figura 3). Sua potencialidade econômica está centrada em suas folhas, com a extração de fibras de alta resistência (MIRANDA et al., 2001). É cultivada

por comunidades indígenas e caboclas na região do Alto Rio Negro, sendo estes consideradas como as maiores conhecedoras e consumidoras dessa matéria-prima (MACIEL, 2008).

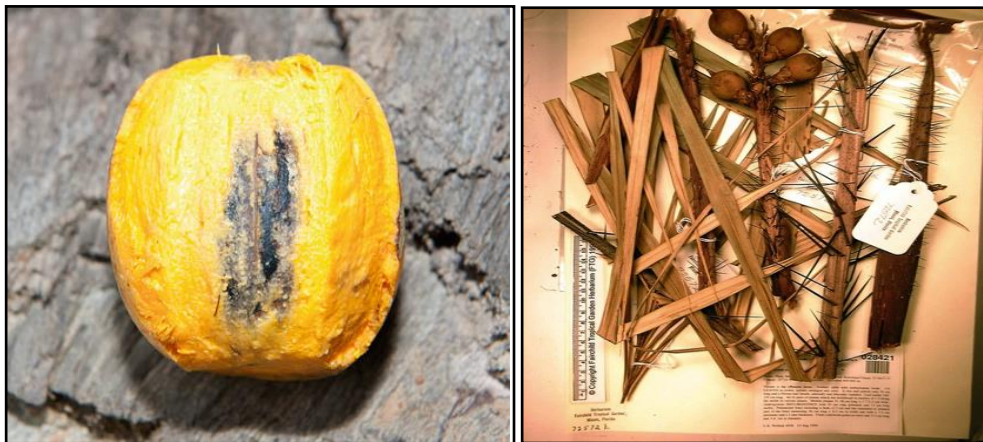


Figura 2. Fruto, folhas e espinhos Fonte: palmguide.org; Smith (2015)



Figura 3. *Astrocaryum acaule* em uma comunidade na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé
Fonte: Patrício (2016)

3.2 Variabilidade genética

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 e ETTORI, 2001). A deriva pode causar a depressão por endogamia e consequentemente, reduzir a capacidade adaptativa, fertilidade, vigor, porte e produtividade, entre outras características (ALLARD, 1971).

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).

A 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 eficiente (FREITAS et al., 2005).

3.3 Marcadores moleculares

Marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente, eles têm sido empregados extensivamente e com sucesso na análise genética de plantas e na caracterização da variabilidade existente entre os indivíduos (GOMES, 2009).

A partir da década de 70, com o advento das técnicas de biologia molecular, dentre as quais se destaca a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), foram desenvolvidos vários métodos de detecção de polimorfismo genético ao nível do DNA. Tais técnicas viabilizaram o surgimento de um número ilimitado de marcadores moleculares para a caracterização genética de indivíduos, populações e espécies (FALEIRO, 2007).

Os tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis possuem estratégias particulares para detectar polimorfismos de DNA, assim variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade (OLIVEIRA et al., 2005).

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 - Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (BOTSTEIN et al., 1980) e minissatélites ou locos VNTR - *Variable Number of Tandem Repeats* (JEFFREYS et al., 1985). 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 e Michelmore, 1993), Microsatélite (LITT e LUTTY, 1989) e AFLP - *Amplified Fragment Length Polimorfism* (VOS et al., 1995).

E ainda, podem ser separados em dois grupos, os codominantes (RFLP, Microsatélites e Isoenzimas) e os dominantes (RAPD e 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., 2002).

Os marcadores moleculares surgiram como uma ferramenta rápida e eficaz na análise de variações genéticas uma vez que detectam o polimorfismo diretamente ao nível de DNA e não sofrem qualquer influência ambiental (SOUZA, 2001). Com base nesse polimorfismo, é possível fazer inferências sobre as relações entre o genótipo e o fenótipo dos indivíduos, o que em última análise permite aumentar a eficiência dos programas de melhoramento, além de melhorar as estimativas da diversidade genética de uma determinada população (JONHS et al., 1997; RODRIGUES, 2001).

Esses marcadores são baseados nas mutações de sequências nucleotídicas dentro do genoma do indivíduo e são definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um segmento específico de DNA, correspondente a regiões expressas ou não do genoma, nos quais a sequência de seus nucleotídeos e a sua função podem ou não ser conhecidas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; YANG et al., 2013). Em outras palavras, são sequências de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos (COUTINHO et al., 2006).

3.3.1 Marcadores AFLP

Diferentes técnicas moleculares podem ser usadas para estudar a diversidade botânica (KARP et al., 1996). Procedimentos baseados em técnicas de biologia molecular são atualmente usados para estimar graus de divergência genética entre populações e espécies de plantas. Entre as técnicas que não requerem sequenciamento, uso de sondas ou bibliotecas genômicas, destaca-se o AFLP (CLEMENTE, 2010).

A técnica AFLP é usada para visualizar centenas de fragmentos de restrição de DNA amplificados simultaneamente. Foi descrita por Vos et al. (1995), associa polimorfismos gerados por enzimas de restrição com a capacidade de detecção da técnica de PCR.

Esta técnica consiste essencialmente de quatro etapas. Na primeira etapa o DNA genômico total do indivíduo é clivado com duas enzimas de restrição (uma de corte raro, combinada com outra de corte frequente). Na segunda etapa, adaptadores específicos são ligados aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem. Na terceira etapa, uma fração dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente via PCR utilizando *primers* especificamente desenhados para reconhecer sequências nos adaptadores. Na quarta e última etapa, a subpopulação de fragmentos amplificados é separada em gel de alta resolução (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Esse marcador se caracteriza por ser altamente polimórfico, permitindo a diferenciação dos indivíduos de uma mesma espécie. Este ainda apresenta uma alta taxa de resolução, sendo altamente reprodutivo com a vantagem de não requerer nenhum tipo de conhecimento prévio sobre o genoma da espécie analisada (LOPES et al., 2002).

Estudos sobre a diferenciação de *E. edulis* pela análise de AFLP com cinco pares de *primers*, apresentaram um total de 429 fragmentos, sendo que 395 foram altamente polimórficos. Neste estudo realizado por Cardoso et al. (2000), os resultados evidenciaram moderada variação genética dentro das populações (57,4%) e entre as populações (42,6%). A diferenciação genética entre as populações foi positivamente relacionada com a distância geográfica ($F_{ST} = 0,426$).

Marcadores AFLPs foram utilizados para avaliar a hipótese da existência de três raças (Pará, Solimões e Putumayo) de pupunheira em estudo de Clement et al. (2002). Pela análise com seis *primers*, os autores obtiveram 245 locos, sendo 145 polimórficos. O dendrograma construído pelo método UPGMA (Método de Agrupamento Hierárquico da Ligação Média) revelou dois grandes grupos: o primeiro grupo confirmou a raça Pará, mas o segundo sugeriu que a raça Solimões não existe; em lugar desta raça, a raça Putumayo se estende ao longo do rio Solimões até a Amazônia Central.

Estudos sobre a diversidade genética de araucária utilizando marcadores AFLP mostraram que parte da variação genética encontra-se dentro de cada população, que apesar da espécie ter sofrido intensa exploração humana, mesmo assim ela ainda mantém sua diversidade genética (SOUZA, 2006).

Em estudos com o marcador genético AFLP para estimar a variabilidade genética de uma população de *Myracrodruon urundeuva*, foi encontrado grande número de bandas polimórficas (total de 137) confirmando a alta variabilidade genética dentro de progênies (FREITAS et al., 2005).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Área de estudo

Foram estudadas três populações de *A. acaule* nos locais: Campus da UFAM (Universidade Federal do Amazonas), Comunidade do Julião na RDS do Tupé (Reserva de Desenvolvimento Sustentável) e Tarumã-Açu (Figura 4).

Por meio de autorização expedida pela Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Sustentabilidade (SEMMAS) foi possível realizar coleta na RDS do Tupé, visto que o acesso a esta Unidade de Conservação é controlado por esta Secretaria. O deslocamento até a Comunidade de Julião foi por via fluvial, a condução de acesso parte do terminal portuário (Marina do Davi) próximo a Ponta Negra, onde é realizado o transporte de passageiros para diversas comunidades relativamente próximas a área urbana de Manaus.

O estudo foi constituído de 90 plantas, 30 de cada população, amostrados aleatoriamente, sendo todas devidamente identificadas e suas posições geográficas registradas (Anexo 1) com GPS (*Global Positioning System*).

Folhas jovens e sadias foram colhidas de cada planta, acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificados, contendo sílica gel e armazenadas à temperatura de -20 °C para posterior extração do DNA e análise com marcadores AFLP no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LAB-MGV) da Faculdade de Ciências Agrárias da UFAM.

Os três locais de coleta possuem características semelhantes, como solos arenosos, alagáveis, próximos a cursos d'água. As populações de *A. acaule* são compostas de vários indivíduos próximos uns dos outros, e em todos os locais visitados, havia indivíduos com frutos.

Na população do Tupé houve grande dificuldade em localizar a espécie em estudo, embora já houvesse relatos de ocorrência desta em áreas na Comunidade, três locais foram visitados, um deles aproximadamente dois km de distância da residência mais próxima, área de floresta primária, pouco iluminada, nesse local os indivíduos possuíam poucas folhas jovens. Os outros dois locais estavam próximos ao rio de acesso à Comunidade, neste caso, área mais aberta, iluminada, os indivíduos

possuíam várias folhas jovens. Na UFAM, a quantidade de indivíduos encontrados foi maior que no Tupé, estes possuíam muitas folhas jovens. E, no Tarumã-Açu grande número de indivíduos foram localizados, muitos estavam frutificando, e quanto ao ambiente, apresenta o mesmo perfil que os outros locais de coletas.



Figura 4. Mapa de localização das populações de *Astrocaryum acaule* estudadas

5.2 Extração e quantificação de DNA

O DNA genômico total foi extraído a partir de amostras das folhas usando o método CTAB 2% (brometo de cetiltrimetilamônio) descrito por Murray e Thompson (1980), modificado. Para cada amostra, macerou-se aproximadamente 80 mg de tecido foliar sem a nervura principal, em cadinho contendo 800 μ L de tampão de extração (CTAB 20%, NaCl 1,4 M, Tris HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 20 mM, 2- β -mercaptoetanol 0,8%, PVP-Polivinilpirrolidona 1% e água ultrapura).

A solução de cada amostra foi transferida para microtubo de 1,5 ml e mantida em recipiente com gelo até o término do processo de maceração. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas mecanicamente por 30 segundos e incubadas em banho-Maria a 60 °C por 30 minutos com homogeneização a cada 10 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, adicionou-se 600 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) na amostra, que foi suavemente homogeneizada por cinco minutos e centrifugada a 14.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para novos tubos, aos quais foram adicionados 450 µL de isopropanol gelado (-20 °C) e, após homogeneização suave, foram incubados a -20 °C por 24h.

Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas por dez minutos a 7.500 rpm e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% por cinco minutos, duas vezes, e uma vez com 1 mL de etanol absoluto, ambos gelados. Após a retirada do etanol o precipitado foi deixado para secar à temperatura ambiente por uma hora para então ser ressuspensionado em 30 µL de TE acrescido de RNase (39:1), incubado em banho-Maria por 30 minutos a 37 °C e posteriormente armazenado a -20 °C.

Na etapa de ajuste do protocolo de extração, para quantificação de DNA, 2 µL de DNA ressuspensionado foi diluído em solução contendo 3 µL do corante azul de bromofenol. Este volume, 5 µL, foi aplicado em gel de agarose 0,8 % (p/v), os géis permaneceram imersos em brometo de etídeo (10 mg/mL). Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese, em tensão de 80 V por 40 minutos. A quantidade de DNA foi avaliada por análise comparativa entre o DNA extraído de cada amostra e um DNA de concentração conhecida (DNA lambda-Invitrogen) em transluminador de UV e fotodocumentados por sistema digital Vilber Lourmat.

Após ajuste no protocolo de extração de DNA, o Nanodrop 2000C do Laboratório de Biotecnologia (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFAM), foi usado para medir a concentração e pureza das 90 amostras, utilizando 2 µL de DNA de cada amostra. Posteriormente, as amostras foram diluídas em água ultrapura para ajustar as suas concentrações para condição de trabalho (30 ng/µL).

5.3 Desenvolvimento de marcadores AFLP

A análise de marcadores AFLP foi realizada de acordo com os procedimentos propostos originalmente por Vos et al. (1995), com modificações de Lopes et al. (2003).

5.3.1 Digestão de DNA

As reações de digestão foram realizadas utilizando-se enzimas de restrição *EcoRI/MseI*, 30 ng/ μ L de DNA genômico, 5,0 μ L do tampão “One Phor All” 10X (OPA; Amersham), 0,5 μ L de solução BSA (Albumina de Soro Bovino) (10 μ g/ μ L), 0,5 μ L da enzima *MseI* (10 U/ μ L, *New England Biolabs*) e 0,5 μ L da enzima *EcoRI* (10 U/ μ L, Gibco) em volume final de 50 μ L. As amostras foram incubadas em termociclador ESCO® PCR *Thermal Cyclers* por 3 h a 37 °C para as reações de restrição e, em seguida, por 15 minutos a 70 °C para inativação das endonucleases.

5.3.2 Preparo e ligação dos adaptadores

Foram preparados adaptadores específicos de *EcoRI* e *MseI* que possuem terminais complementares às extremidades resultantes da digestão pelas enzimas de restrição. O adaptador *EcoRI* foi preparado utilizando 5,6 μ L de adaptador *EcoRI forward*, 4,8 μ L de adaptador *EcoRI reverse*, 6 μ L de tampão OPA (Amersham®) e água ultrapura esterilizada para o volume final de 120 μ L.

O adaptador *MseI* foi preparado utilizando 64 μ L de adaptador *MseI forward*, 56 μ L de adaptador *MseI reverse*, 7 μ L de tampão OPA (Amersham®) e água ultrapura esterilizada para o volume final de 140 μ L. Ambos os adaptadores foram incubados no termociclador ESCO® PCR *Thermal Cyclers*, a temperaturas de 65, 37 e 25 °C, com duração de dez minutos cada.

Para a reação de ligação dos adaptadores foi utilizado 1,0 μ L de adaptador *EcoRI*, 1,0 μ L de adaptador *MseI*, 1,0 μ L de tampão para a enzima T4 DNA Ligase (10X), 0,33 μ L da enzima T4 DNA Ligase (3 U/ μ L) (Promega®) e água ultrapura esterilizada completando o volume para 10 μ L. Este mix foi adicionado a 50 μ L do DNA digerido com as enzimas de restrição. As amostras foram incubadas em termociclador a

23 °C por 3 h e armazenadas a -20 °C. Na Tabela 1 são apresentados sítios de restrição das enzimas utilizadas no estudo e sequência dos adaptadores.

Tabela 1. Sítios das enzimas de restrição e sequências de adaptadores usados no estudo

Enzima	Sítio de Restrição	Especificação	Sequência
<i>EcoRI</i>	5' G AATTC 3'	Adaptador <i>forward</i>	5' - CTC GTA GAC TGC GTA CC - 3'
	3' CTAA G 5'	Adaptador <i>reverse</i>	5' - CAT CTG ACG CTA GGT TAA - 3'
<i>MseI</i>	5' T TAA 3'	Adaptador <i>forward</i>	5' - GAC GAT GAG TCC TGA G - 3'
	3' AAT T 5'	Adaptador <i>reverse</i>	5' - TAC TCA GGA CTC AT - 3'

5.3.3 Reações de amplificação

Os genomas de plantas por serem mais complexos necessitam de uma pré-seleção de fragmentos a serem amplificados. Nesta etapa, comumente chamada de pré-amplificação, foram utilizados 0,6 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,4 µL de dNTPs (10 mM), 0,5 µL de cada oligonucleotídeo contendo um nucleotídeo seletivo adicionado à extremidade 3': oligo *EcoRI* (25 ng/µL) + A e oligo *MseI* (25 ng/µL) + C, 1,0 µL de tampão da enzima Taq DNA polimerase (10X) (Fermentas®), 0,3 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) (Fermentas®), 2,5 µL de DNA digerido e ligado, e água ultrapura para completar o volume para 10 µL.

As amostras foram incubadas em termociclador a 94 °C por dois minutos, seguidos de 26 ciclos de 94, 56 e 72 °C, com duração de um minuto para cada temperatura, e uma extensão final de 72 °C por cinco minutos. Terminada a reação de PCR foram acrescentados 40 µL de água ultrapura a cada amostra, as quais foram armazenadas a -20 °C. As sequências dos oligonucleotídeos usados na reação de pré-amplificação encontram-se na Tabela 2.

Na segunda reação de amplificação, conhecida como amplificação seletiva, os iniciadores utilizados possuem mais dois nucleotídeos arbitrários adicionais, o que torna a seleção bem mais significativa. Para esta etapa foram utilizadas quatro combinações de *primers* (Tabela 2) para análise da qualidade de amplificação e do número de locos polimórficos amplificados.

Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos usados para as análises de polimorfismo de comprimentos de fragmentos amplificados

Enzima	Etapa	Especificação	Sequência
<i>EcoRI</i>	Pré-amplificação	<i>Primer E + A</i>	5' GAC TGC GTA CCA ATT CA – 3'
	Amplificação seletiva	<i>Primer E + ACA</i>	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAC A – 3'
		<i>Primer E + AAC</i>	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAA C – 3'
<i>MseI</i>	Pré-amplificação	<i>Primer M + C</i>	5' GAT GAG TCC TGA GTA AC – 3'
	Amplificação seletiva	<i>Primer M + CGC</i>	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACG C – 3'
		<i>Primer M + CAC</i>	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACA C – 3'
		<i>Primer M + CGA</i>	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACG A – 3'

Para as reações de amplificação seletiva foram utilizados 1,2 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,4 µL de dNTPs (10 mM), 1,0 µL do oligo *EcoRI* (25 ng/µL) + ANN, 1,2 µL do oligo *MseI* (25 ng/µL) + CNN (Em que N é o nucleotídeo arbitrário usado na amplificação seletiva), 2,0 µL de tampão da enzima Taq DNA polimerase (10X) (Fermentas®), 0,2 de Taq DNA polimerase (5 U/µL) (Fermentas®), 1,5 µL de DNA das amostras pré-amplificadas, e água ultrapura para completar o volume de 20 µL.

As amostras foram incubadas em termociclador à temperatura 94 °C por dois minutos, seguida de 12 ciclos de 94, 65 e 72 °C com duração de 30, 30 e 60 segundos, respectivamente, mais 23 ciclos de 94, 56 e 72 °C com duração de 30, 30 e 60 segundos, respectivamente, e uma extensão final de 72 °C por dois minutos. As amostras foram armazenadas a -20 °C.

Das quatro combinações testadas, três (E+AAC/M+CAC, E+ACA/M+CGC e E+AAC/M+CGA) foram selecionadas, por apresentar maior número de locos polimórficos e melhor qualidade de amplificação das bandas.

5.3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (acrilamida/bis-acrilamida (19:1 v/v)). Para o preparo da matriz de poliacrilamida foram utilizados 50,4 g de uréia, 0,36 g de bis-acrilamida e 7,2 g de acrilamida e tampão 1X TEB (Tris base, Ácido bórico e EDTA) para completar o volume de 120 mL. Foi usado o sistema de gel de sequenciamento "Sequi-Gen GT" (Biorad), fonte de 3.000 V.

As placas foram limpas duas vezes com etanol 95%. Na placa maior (acrílico), foram aplicados 1,5 mL de *Repel* químico e na placa menor foi aplicada uma solução

contendo 1 mL de etanol 95%, 5 µL de ácido acético glacial e 5 µL de *bind* químico. Após cinco minutos, as placas foram limpas duas vezes novamente com álcool 95%, neste caso com leves movimentos, apenas para a retirada do excesso das soluções. Foram utilizados lenços de papel, tanto na limpeza das placas como na aplicação e retirada do excesso das soluções.

Para o preparo do gel de poliacrilamida, utilizou-se 150 mL da matriz, 150 µL de TEMED e 1 mL de persulfato de amônia (95 mg/mL). O gel permaneceu, no mínimo, por 4 h em processo de polimerização. Na parte superior da cuba foi utilizado aproximadamente 1,2 L TEB 1X e na parte inferior 350 mL de TEB 1X e 50 mL de acetato de sódio 3M. Antes da aplicação das amostras, foi realizada uma pré-corrida conduzida sob potência constante de 80 W durante 1 h, para aquecimento e limpeza do gel.

Ao produto da amplificação seletiva foram adicionados 8 µL de *loading buffer* (formamida 98%, EDTA 10 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,002% (p/v) e xilenocianol 0,002% (p/v)) e incubadas no termociclador por cinco minutos à temperatura de 95 °C para desnaturação. Em seguida, foram aplicados 20 µL da amostra desnaturada no gel para eletroforese sob potência constante de 80 W durante 4 h.

5.3.6 Revelação do gel

Para a revelação do gel, usou-se o método de coloração com nitrato de prata segundo o protocolo proposto por Creste et al. (2001).

A placa com o gel foi imersa em 3 L de solução para fixação (etanol 10% e ácido acético glacial 1%) durante dez minutos, seguida de lavagem em 3 L de água destilada por um minuto. Realizou-se então, um pré-tratamento com solução de oxidação (ácido nítrico 1,5% - 3 L) durante 2,40 minutos e uma lavagem em 3 L de água destilada por um minuto.

Para a impregnação foram utilizados 3 L da solução de nitrato de prata (AgNO_3 0,2%) por 20 minutos, seguida de duas lavagens de 30 segundos em 3 L de água destilada cada. A revelação foi feita em duas etapas, ambas utilizando 1,5 L de solução para revelação (Na_2CO_3 3% e formaldeído 0,02%), durando a primeira etapa tempo de

surgimento das primeiras bandas e a segunda até a obtenção do padrão de revelação desejado.

Por fim, a placa foi colocada em 3 L de solução bloqueadora (ácido acético glacial 5%) por cinco minutos e lavada em 3 L de água destilada durante um minuto e mantida à temperatura ambiente para secar. Todos os procedimentos foram realizados dentro de bandejas plásticas e sob agitação constante.

5.4 Análises de diversidade e estrutura genética

A partir dos fragmentos obtidos foi construída uma matriz binária, em que zero e um indicaram ausência e presença de fragmentos, respectivamente. Estes dados foram usados na construção de uma matriz de dissimilaridade por meio do complemento aritmético do coeficiente de Jaccard obtido pela expressão:

$$D_j = 1 - \left(\frac{a}{a + b + c} \right)$$

Sendo a a presença de banda em ambos os acessos, b a presença de banda no primeiro e ausência no segundo, e c a ausência no primeiro e presença no segundo acesso.

Posteriormente, a matriz de dissimilaridade foi submetida à análise de agrupamento pelo método de agrupamento hierárquico da ligação média entre grupos (UPGMA), cujo resultado pode ser visualizado na forma gráfica de um dendrograma.

A construção do dendrograma foi estabelecida pelo genótipo de maior similaridade. O primeiro grupo foi formado pelos genótipos mais similares e, em seguida, calculou-se novamente a distância entre todos os genótipos, considerando o grupo formado anteriormente como um genótipo apenas, sendo novamente agrupados os indivíduos dos grupos de maior similaridade e assim sucessivamente. A distância entre os grupos foi determinada pela média das distâncias entre pares de indivíduos pertencentes aos diferentes grupos. A expressão geral para este método é dada a seguir:

$$d_{(ij)k} = \frac{n_i}{n_i + n_j} d_{ik} + \frac{n_j}{n_i + n_j} d_{jk}$$

sendo, $d_{(ij)k}$ a distância entre o grupo (ij), com tamanho interno n_i e n_j , respectivamente, caracterizando i, j e k como indivíduos ou grupos (CRUZ et al., 2011).

Tanto as matrizes de dissimilaridade como os dendrogramas foram obtidos com o *software* estatístico R (*R Development Core Team*, 2013). O *software* R também foi empregado para gerar a matriz dos valores cofenéticos e testar a adequação da análise de agrupamento aos dados originais.

Para analisar a diversidade genética entre as populações, os dados obtidos a partir dos marcadores AFLP foram usados na construção de uma matriz de distâncias genéticas com base na distância genética de Nei (NEI, 1978).

Mediante as estimativas de identidade genética e distância genética de Nei (1978), foram construídos dendrogramas pelo método UPGMA. Considerou-se que,

$$\hat{D} = \ln \hat{I};$$

o índice de identidade genética ($\hat{I}$), baseia-se em frequências alélicas de locos homólogos nas diferentes populações. A expressão é a seguinte:

$$\hat{I} = \frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x - J_y}} ;$$

sendo, J_{xy} , J_x e J_y as médias aritméticas de j_{xy} , j_x e j_y , respectivamente, sobre todos os locos polimórficos e monomórficos. Onde, $j_{xy} = \sum x_i^2$ é a probabilidade de dois genes escolhidos ao acaso na população x serem idênticos; $j_x = \sum y_i^2$ é a probabilidade de dois genes escolhidos ao acaso na população y serem idênticos e $j_y = \sum x_i y_i$ é a probabilidade de identidade de um gene da população x e um gene da população y serem idênticos.

Posteriormente, foi aplicada a análise de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS), em que a maior dispersão das unidades foi identificada como havendo maior dissimilaridade genética. Para a obtenção das análises foi utilizado o pacote *Vegan* do *software* R.

O procedimento partiu de uma organização inicial que, interativamente, reorganizou os indivíduos de maneira a diminuir o *stress* (*STandard RESiduals Sum of Squares*). O *stress* (S) é uma função que informa a magnitude da perda de informação na matriz de dissimilaridade com a utilização do procedimento, sendo esta uma medida do quanto as posições dos indivíduos em uma configuração n-dimensional desviam-se das reais distâncias (dissimilaridades) após o escalonamento. O *stress* foi interpretado pelo valor de $R^2 = 1 - S^2$ (OKSANEN et al., 2013).

Pelo pressuposto de que as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, o programa Popgene versão 1.32 (YEH et al., 1999) foi usado para o cálculo da variação genética em cada população. As estimativas de diversidade intrapopulacional incluíram a heterozigosidade esperada, H_e (NEI, 1978) e o índice de diversidade genética de Shannon e Weaver, I (SHANNON e WEAVER, 1949).

Em análise adicional, foi estimado o valor de fluxo gênico médio entre as populações. Para investigar a correlação entre a distância geográfica e a diversidade genética das populações foi utilizado o teste de Mantel (MANTEL, 1967), a partir do *software* estatístico R com 999 permutações.

A abordagem bayesiana implementada no *software Structure* v.2.4 (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2003) foi utilizada para revelar a estrutura das populações. O número de interações utilizadas no *burn-in* e MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) foram de 100.000 e 200.000, respectivamente.

Nas análises, foi considerado o modelo de mistura com frequências correlacionadas com a incorporação das informações sobre locais de amostragem. Foram testados valores de agrupamento (K) variando de 1 a 8 com cinco repetições idênticas para cada valor de K testado. O valor mais provável de K foi determinado pelo critério ΔK descrito por Evanno et al. (2005) a partir do programa *Structure Harvester* (EARL e VONHOLDT, 2011).

A distribuição da variação genética entre e dentro das populações foi quantificada pela análise da variância molecular (AMOVA), realizada pelo programa GenALEX v.6.5 (PEAKALL e SMOUSE, 2012).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Extração e quantificação de DNA

O protocolo de extração de DNA utilizando o detergente CTAB 2%, mostrou-se eficiente para todas as populações de *A. acaule*. Foi possível extrair o DNA genômico total das amostras analisadas em quantidades e qualidades satisfatórias.

Não foi possível utilizar folhas frescas devido a distância do local de origem das amostras. Assim, foi necessária a preservação das amostras, por desidratação das folhas em sílica gel e posterior armazenamento em *freezer* (-20 °C) até que fosse realizada a extração.

Este método de preservação oferece inúmeras vantagens, principalmente, devido à sua simplicidade, otimização de espaço físico tanto para o transporte quanto para armazenamento no laboratório, bem como pela preservação do DNA das amostras dessecadas por longo prazo. Outras vantagens de se usar tecido seco em estudos moleculares é o fato de poder ser rompido com maior facilidade e a qualidade do DNA ser, em geral, satisfatória.

6.2 Seleção de *primers*

Entre as quatro combinações de *primers* testadas, todas detectaram nível adequado de polimorfismo, produzindo fragmentos de boa qualidade, intensidade e com bom perfil de amplificação. Destas, apenas três combinações foram usadas neste trabalho, devido à repetibilidade, ao número de fragmentos e ao número de locos polimórficos amplificados.

6.3 Diversidade entre indivíduos

Dentre as combinações de *primers* selecionadas, a que obteve melhor amplificação dos locos foi a E+AAC/M+CAC, embora as outras combinações E+ACA/M+CGC e E+AAC/M+CGA, mostrassem resultados semelhantes (Tabela 3). As três combinações geraram um total de 200 fragmentos e, destes, 198 (99%) foram

polimórficos. A porcentagem de locos polimórficos foi superior à obtida por Cardoso et al. (2000) trabalhando com *E. edulis*. Estes autores, utilizando cinco combinações de *primers* AFLP, obtiveram 429 locos, destes, 395 (92%) foram polimórficos.

Tabela 3. Polimorfismo obtido em subamostras de *Astrocaryum acaule* a partir de três combinações de oligonucleotídeos utilizando marcadores AFLP

Combinações de oligonucleotídeos	Total de locos	Locos Polimórficos	Polimorfismo (%)	Gama de tamanho (Pp)
E+ACA/M+CGC	60	59	98,33	50 - 500
E+AAC/M+CAC	72	72	100,00	
E+AAC/M+CGA	68	67	98,53	
Total	200	198	99,00	-

O dendrograma gerado com base no complemento aritmético da distância genética de Jaccard e método de agrupamento UPGMA das 90 subamostras de *A. acaule* permitiu a formação de vários grupos. Dentre esses, os indivíduos da população do Tarumã-Açu se destacaram como sendo geneticamente diferentes das outras duas populações, UFAM e Tupé (Comunidade do Julião), que mostram ser próximas geneticamente (Figura 5).

Porém, alguns indivíduos da população do Tupé (TU19, TU18 e TU11) são mais divergentes que os demais desta população (Figura 5). É importante destacar que o coeficiente de correlação cofenética ($r = 0,9011$) mostrou bom ajuste do dendrograma em relação à matriz de dissimilaridade.

Embora as subamostras das populações UFAM e Tupé formem grupos menores separadamente, de modo geral, eles não demonstram ser geneticamente divergentes. Apesar de estarem presentes em um ambiente urbano, os indivíduos coletados na população UFAM pertencem a uma área de conservação, e a população Tupé está inserida na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé, ambas as regiões com acesso restrito à população humana.

Por manter intacta grande parte da biodiversidade naturalmente observada, estes locais são alvo de estudos de morfologia e reprodução de várias espécies vegetais, sendo, contudo, de menor interferência antrópica. No entanto, ao contrário do que ocorre nas populações citadas acima, a população Tarumã-Açu localiza-se em

área com grande interferência humana, onde os moradores locais têm livre acesso às áreas de coleta de sementes.

Esta informação pode levantar a hipótese de que houve maior fluxo gênico de outras áreas de *A. acaule* para a população Tarumã-Açu. Assim, é possível que o homem seja um importante dispersor das sementes de *A. acaule*, fazendo com que haja intenso fluxo gênico, apesar da presença de barreiras geográficas.

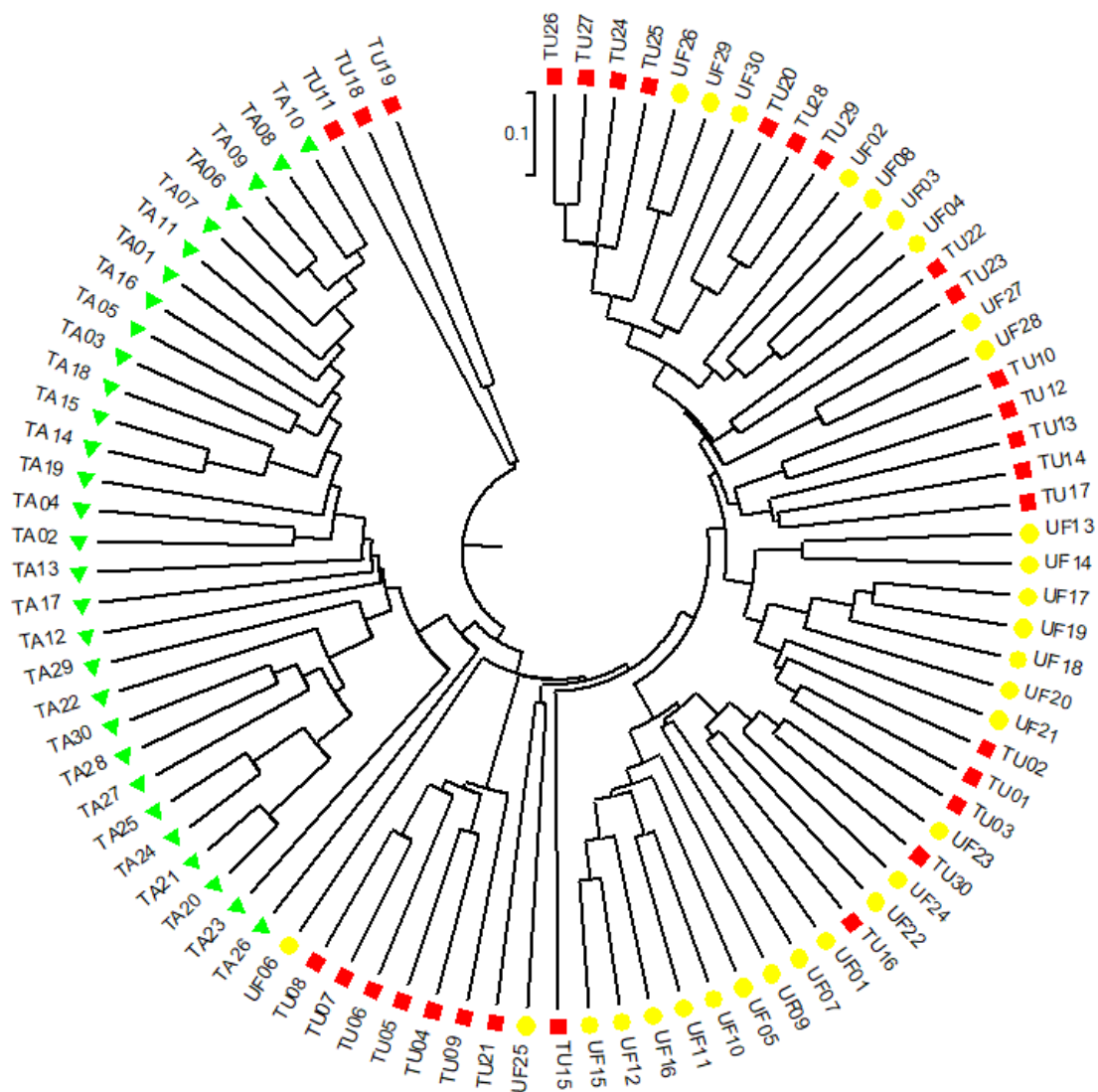


Figura 5. Dendrograma gerado pelo programa MEGA7, com base no complemento aritmético da distância genética de Jaccard e método de agrupamento UPGMA em 90 subamostras de *Astrocarum acaule* prospectadas em área da UFAM (círculo amarelo), Tupé (quadrado vermelho) e Tarumã-Açu (triângulo verde). Coeficiente de correlação cofenética $r = 0,9011$

Por meio do método de otimização *Tocher*, as subamostras foram separadas em sete grupos (Tabela 4). Das 90 subamostras, 75 foram agrupadas em um grupo, sendo que estas incluíram 29 indivíduos da população do Tarumã-Açu e outros das populações UFAM e Tupé. As outras 15 subamostras formaram os outros seis grupos, sendo que TU18, TU19 (grupo 3) e TU11 (grupo 6), assim como no dendrograma (Figura 5), mantiveram-se separadas das demais.

Tabela 4. Agrupamento de 90 subamostras de *Astrocaryum acaule* pelo método de otimização de Tocher, baseado na matriz de distância genética obtida pelo complemento aritmético do índice de Jaccard

Grupos	Subamostras
1	TA20, TA21, TA24, TA25, TA28, TA27, TA30 TA22, TA18, TA14, TA15, TA09, TA10, TA08, TA06, TA07, TA01, TA11, TA16, TA05, TA03, TA19, TA02, TA04, TA13, TA17, TA12, TA29, TA23, UF03, UF09, UF10, UF02, UF04, UF08, TU27, TU29, TU26, UF15, TU01, UF21, TU20, TU28, TU24, TU25, UF17, UF19, UF18, TU03, UF13, UF14, UF12, UF05, UF16, UF20, TU02, UF29, UF30, UF26, UF22, TU12, TU10, UF01, TU16, UF11, TU23, TU17, TU13, TU30, UF23, UF24, TU14, TU21, UF28, UF27
2	TU07, TU08, TU05, TU04, TU09, TU06
3	TU18, TU19
4	UF06, UF07
5	UF25, TU22, TU15
6	TU11
7	TA26

A representação da relação de similaridade entre as submostras a partir de dois eixos foi realizada pela análise de escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) (Figura 6). Os componentes da população Tarumã-Açu ficaram mais próximos entre si, formando um grupo a parte dos indivíduos das populações Tupé e UFAM, confirmando os resultados das análises anteriores. O coeficiente de determinação ($R^2 = 95,81$) indicou ajustamento satisfatório das distâncias genéticas originais com as distâncias representadas nesta análise.

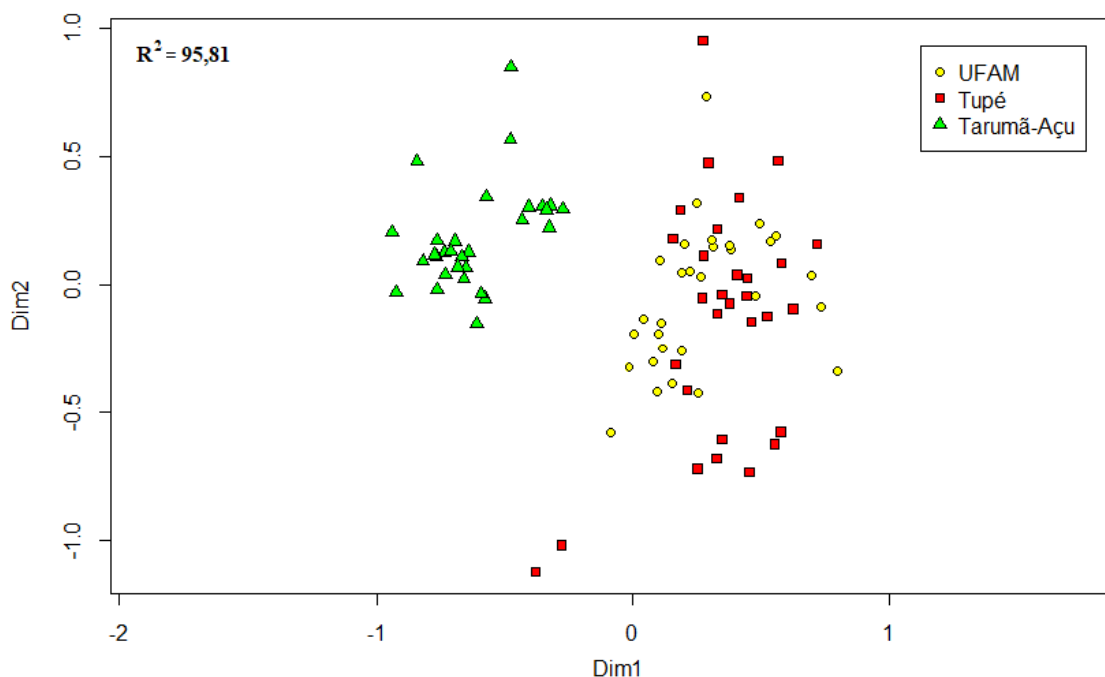


Figura 6. Análise de escalonamento multidimensional não-métrica das distâncias genéticas entre 90 subamostras de *Astrocaryum acaule* prospectadas em três populações

Para determinar os padrões genéticos de diferenciação e subestruturação populacional, foi feita a análise bayesiana pelo *software Structure* e, de acordo com o método ΔK descrito por Evanno et al. (2005), o número mais provável de agrupamentos foi $K = 2$ (Figura 7). A visualização gráfica da estrutura populacional permitiu identificar facilmente dois grupos, um formado pelas subamostras de Tarumã-Açu e outro formado pela maioria das subamostras das populações UFAM e Tupé, concordando novamente com as análises anteriores.

Através de um alinhamento crescente da estrutura populacional obtida de acordo com o valor de K testado, é possível compreender a relação entre as populações (VIANA et al., 2013). Deste modo, mesmo considerando $K = 3$, os indivíduos de UFAM e Tupé ainda foram alocados em mesmo grupo e a população Tarumã-Açu tendeu a se dividir em dois agrupamentos. Este fato ressalta a alta similaridade genética obtida entre as duas primeiras populações.

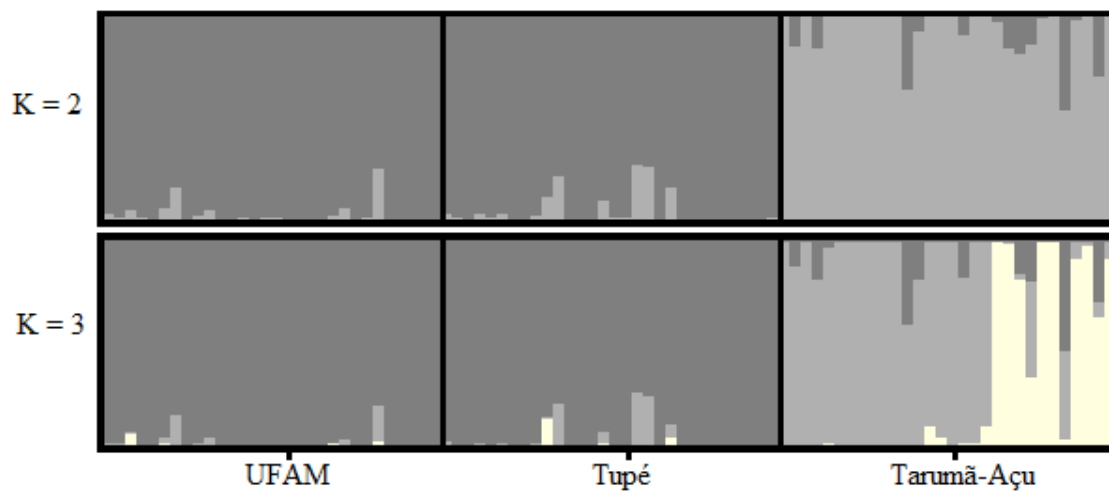


Figura 7. Estrutura populacional empregando o programa *Structure* a partir de 90 subamostras de *Astrocaryum acaule* prospectadas de três populações, considerando diferentes números de agrupamentos (K)

6.4 Diversidade entre populações

O dendrograma obtido com base na distância genética de Nei sugere similaridade genética entre as populações UFAM e Tupé e demonstra que a população Tarumã-Açu é realmente diferente das demais (Figura 8). Conforme já relatado anteriormente, as populações UFAM e Tupé estão presentes em áreas consideradas de conservação, sendo alvo de estudo de muitas espécies vegetais, incluindo *A. acaule*.

A área da UFAM é inclusive cercada, evitando tráfico de pessoas enquanto a população do Tupé encontra-se em área isolada, longe de povoamento e com maior dificuldade de acesso humano. Já a população do Tarumã-Açu está em área de livre acesso e com maior possibilidade de interferência antrópica tanto para a troca de genes com populações de outras regiões, como pela perda de genes causada pelo desmatamento para crescimento urbano. Esses fatores podem ter alterado a variabilidade genética dentro desta população, levando a um maior distanciamento desta em relação às populações da UFAM e Tupé.

Apesar da maior distância geográfica ser entre as populações UFAM e Tupé, e ainda estarem separadas por cursos d'água, estas são geneticamente mais próximas.

Todavia, Cardoso et al. (2000) em estudo de diversidade genética da palmeira *E. edulis*, obtiveram resultados que indicam que a distância genética não depende unicamente da distância geográfica, embora na maioria dos casos, o agrupamento baseado em distâncias genéticas reflète relações geográficas.

No presente estudo, deve-se considerar outro importante fator que pode ser correlacionado com a distância genética, o isolamento físico. Este dificulta ou inibe o acesso humano a diferentes áreas, pode ser considerado fator fundamental para o distanciamento observado entre populações isoladas de acesso restrito com aquelas populações de livre acesso humano para intercâmbio de sementes.

Uma hipótese pode ser levantada, inicialmente as três populações poderiam fazer parte de uma única população, resultante do mesmo banco de sementes. Após fragmentação urbana e maior isolamento físico das populações UFAM e Tupé, estas se distanciaram geneticamente da população Tarumã-Açu, uma vez que esta última é inserida em uma área de livre acesso humano, possibilitando maior troca de material genético com germoplasmas de outras regiões.

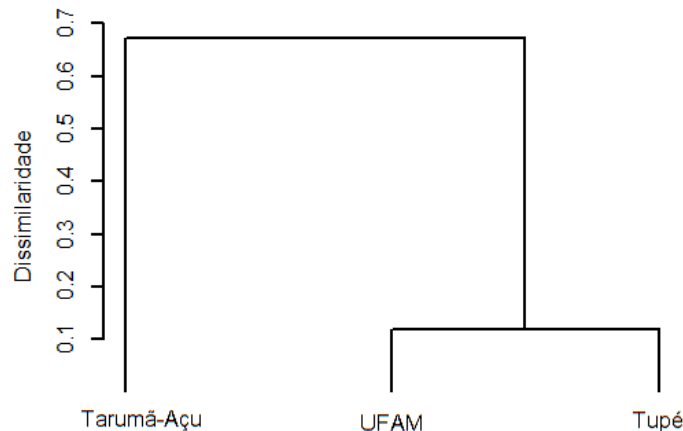


Figura 8. Análise de agrupamento UPGMA a partir da distância genética de Nei (1972), para três populações de *Astroocaryum acaule*. Coeficiente de correlação cofenética: $r = 0,9954$

A estatística de Mantel (Figura 9) indicou relação positiva ($r = 0,4076$) e significativa ($P = 0,001$) entre a distância geográfica e distância genética, porém de magnitude moderada. Assim, a distância geográfica exerce influência na divergência

genética das populações estudadas, mas este pode não ser o fator determinante, isto ajuda a entender a semelhança genética entre as populações UFAM e Tupé.

Este resultado foi diferente do encontrado por Oliveira et al. (2014), no seu estudo de *A. jauari* onde o teste de Mantel demonstrou alta correlação, mas não significativa ($r = 0,998$, $P = 0,167$), indicando que a relação entre as populações é independente das distorções geográficas. Tal fato, pode estar sendo influenciado pelo isolamento físico das populações UFAM e Tupé.

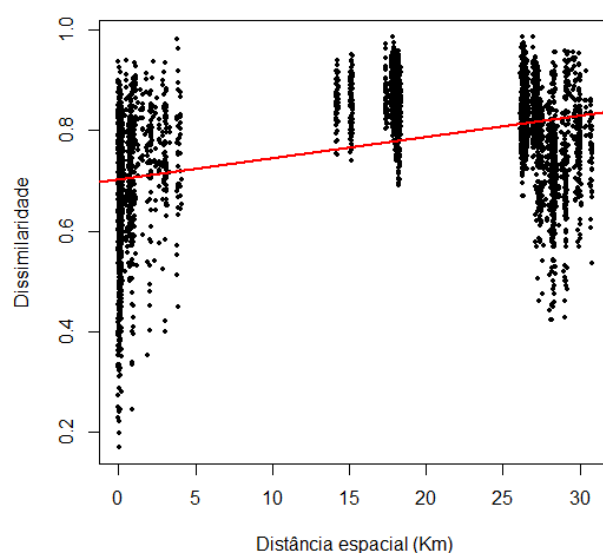


Figura 9. Teste de mantel (distância geográfica vs distância genética), $r = 0,4076$ e Nível de significância (P) = 0,001. Linha em vermelho representa a regressão linear entre distância espacial x dissimilaridade

O coeficiente de diferenciação populacional (G_{st}), obtido conforme Nei (1973), foi igual a 0,1473. Partindo do princípio de que o fluxo gênico (N_m) pode ser estimado a partir de valores de G_{st} ($N_m = 0.5 (1 - G_{st})/G_{st}$) e reconhecendo que todos os pressupostos necessários para o cálculo muitas vezes não são cumpridos (WHITLOCK e MCCAULEY, 1999), quando todas as populações foram consideradas como um grupo de populações, o fluxo gênico médio estimado entre elas foi de $N_m = 2,89$.

Esta estimativa foi semelhante à obtida por Cardoso et al. (2000) em estudo com *E. edulis* ($N_m = 2,99$) e bem abaixo do obtido por Adin et al. (2004) para pupunheira

(Nm = 4,8) a partir de marcadores AFLP e em populações interconectadas por via fluvial. É importante destacar que valores de Nm maiores que 1,0 indicam que o fluxo gênico será alto o suficiente para prevenir uma diferenciação entre as populações devido à deriva (SLATKIN e BARTON, 1989).

6.5 Diversidade dentro de populações

Os valores da heterozigosidade esperada (He) e o índice de diversidade genética de Shannon e Weaver (I) não apresentaram grandes variações entre as três populações (Tabela 5). Contudo, os maiores valores de He (0,2169) e I (0,3413) foram encontrados na população Tarumã-Açu, indicando maior diversidade genética dentro desta população.

Estes resultados já eram esperados, devido esta população estar mais propícia a receber material genético de outras regiões e, assim, os indivíduos que a compõem apresentarem maior variabilidade genética. No entanto, os valores obtidos para as populações estudadas foram menores que os estimados por Oliveira et al. (2014) ao analisarem as populações de *A. jauari*, com base em marcadores moleculares microssatélites, onde a diversidade genética média para uma população foi de 0,56 e para outras duas 0,63 e 0,58. O percentual de polimorfismo detectado dentro das populações (84,85%, 83,33% e 85,86%) indicou que as combinações de *primers* selecionados para este estudo foram suficientes para analisar a diversidade genética intraespecífica, pois alta porcentagem de locos polimórficos foi detectada mesmo quando o número de indivíduos analisados foi reduzido de 90 para 30 indivíduos.

Tabela 5. Diversidade genética dentro de populações de *Astrocaryum acaule* e em nível de espécie

População	N	P(%)	He	I
UFAM	30	84,85%	0,2012 (±0,0117)	0,3222 (±0,0162)
Tupé	30	83,33%	0,1864 (±0,0112)	0,3034 (±0,0156)
Tarumã-Açu	30	85,86%	0,2169 (±0,0123)	0,3413 (±0,0169)
Espécie	90	100,00%	0,2363 (±0,1385)	0,3819 (±0,1819)

N = tamanho da amostra; P = percentagem de polimorfismo; He = heterozigosidade esperada de Nei (1973) (assumido o equilíbrio de Hardy-Weinberg); I = índice de diversidade genética de Shannon e Weaver (1949). Dentro de parênteses está o desvio padrão dos parâmetros considerados

6.6 Diversidade entre e dentro de populações

A quantidade de variação genética obtida pela Análise de Variância Molecular – AMOVA (Tabela 6) mostrou que 74,58% da variabilidade genética encontra-se entre os indivíduos dentro das populações e 25,42% entre as populações analisadas. Estes resultados mostram que estratégias semelhantes de amostragem e/ou conservação podem não ser igualmente eficazes em todas as populações analisadas.

Os resultados encontrados estão de acordo aos apresentados na literatura para populações naturais de espécies arbóreas tropicais que mostram que, em geral, a maior parte da diversidade genética encontra-se dentro das populações (GOMES et al., 2011; ROSSI et al., 2014). Estudos realizados com outras espécies de palmeiras encontraram resultados semelhantes, como Gomes et al. (2011), onde os autores relataram que a variabilidade entre e dentro de populações de *M. flexuosa* foi de 22,82 e 77,18 %, respectivamente. Buttow et al. (2010) obtiveram 83,68% dentro das populações de *B. capitata* e 13,67 % entre elas, e Cardoso et al. (2000) obtiveram 57,40% dentro e 42,60% entre populações de *E. edulis*.

Tabela 6. Variação genética obtida pela Análise de Variância Molecular – AMOVA entre e dentro de populações naturais de *Astrocaryum acaule*

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios	Componente de Variância	% da Variação
Entre Populações	2	296,3778	8,9991**	25,42
Dentro de Populações	87	26,4034	26,4034**	74,58
Total	89	32,4703	35,4025	100,00
Fst = 0,2542				

** P < 0,01

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que grande parte da variação genética da espécie está a nível intrapopulacional. Assim, planos de uso e conservação da espécie devem observar a variabilidade genética encontrada nessas populações, visando garantir a preservação de seus recursos genéticos.

Para a conservação deve-se levar em consideração o padrão de variabilidade genética encontrado em *A. acaule*, sendo necessária uma amostragem representativa do conjunto de genes contidos nos indivíduos de cada grupo, com a amostragem de indivíduos dos dois grupos (1–Tarumã-Açu e 2–UFAM e Tupé), uma vez que a maior diversidade está dentro das populações. Para realizar a conservação genética, essa amostragem pode levar a um elevado número de indivíduos a compor uma coleção *ex situ*. As coleções estabelecidas em campo demandam recursos permanentes para a manutenção. Gomes et al. (2011) relataram que seria melhor fomentar a conservação participativa *in situ* nas áreas de ocorrência das espécies perenes nativas da região Amazônica.

7 CONCLUSÕES

O protocolo modificado de Murray e Thompson (1980), utilizando método CTAB 2% (brometo de cetiltrimetilamônio) gerou amostras de *A. acaule* em quantidade e qualidade satisfatórias para análises com marcadores AFLP.

Os marcadores moleculares do tipo AFLP revelaram alto conteúdo de informação genética em *A. acaule* e podem ser utilizados para análises genéticas, visando obter informações para a sustentabilidade genética e manejo da espécie.

A distribuição da diversidade genética nas populações estudadas de *A. acaule* foi maior dentro das populações que entre elas, sendo necessário obter amostras representativas de cada um dos grupos geneticamente distintos para a conservação genética da espécie, assim a conservação *in situ* é mais indicada.

8 REFERÊNCIAS

- ADIN, A.; WEBER, J. C.; MONTES, C. S.; VIDAURRE, H.; VOSMAN, B.; SMULDERS, M. J. M. Genetic differentiation and trade among populations of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) in the Peruvian Amazon - implications for genetic resource management. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, n. 8, p. 1564 - 1573, 2004.
- ALLARD, R.W. Princípios do melhoramento genético das plantas. São Paulo: Edgard Blücher, 1971. p. 381.
- ARAÚJO, M. G. P.; STORTI, E. F. Interações ecológicas de *Astrocaryum acaule* Mart. (Arecaceae) no período reprodutivo. In: 59º Congresso Nacional de Botânica. Natal. 2008.
- ARECACEAE. *Astrocaryum acaule*. Fairchild Tropical Botanic Garden. 2006. Disponível em: <<http://palmguide.org/sheet.php?sheet=72572>> Acessado em 10 de agosto de 2015.
- BALICK, M. J.; BECK, H. T. Useful palms of the world. **A synoptic bibliography**. New York: Columbia University Press. 1990. p. 742.
- BALICK, M. J. Ethnobotany of palms in the Neotropics. **Advances in Economic Botany**, v. 1, p. 9-23, 1984.
- BARBOSA, T. C. T. S.; BARROZO, G. C. S.; QUEIROZ, M. S. M. Morfologia floral de *Astrocaryum acaule* e *Astrocaryum gynacanthum* (Arecaceae, Arecoideae). In: 56º Congresso Nacional de Botânica. Curitiba. 2005.
- BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, n. 32, p. 314-331. 1980.
- CARDOSO, S. R. S. et al. Genetic Differentiation of *Euterpe edulis* Mart. Populations estimated by AFLP Analysis. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1753-1760, 2000.
- CARDOSO, S. R. S.; ELOY, N. B.; PROVAN, J.; CARDOSO, M. A.; FERREIRA, P. C. G. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. Populations estimated by AFLP analysis. **Molecular Ecology**, v.9, n.11, p.1753- 1760, 2000.
- CLEMENT, C. R. et al. Use of AFLPs to distinguish landraces of Pajibaye (*Bactris gasipaes*) in Brazilian Amazonia. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 4, p. 749-753, 2002.
- CLEMENT, C. R.; LLERAS PÉREZ, E.; VAN LEEUWEN, J. O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. **Agrociências**, v.9, n.1-2, p.67-71. 2005.

CLEMENTE, M. S. Análise da variação genética de populações de *Vochysia pyramidalis* e *V. tucanorum* por AFLP e da composição de ácidos graxos de sementes. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 2010. 105 p.

COUTINHO, H. D. M.; MILITÃO NETO, V.; VERDE, L. C. L. Técnicas com marcadores moleculares usadas nas ciências da saúde; Molecular marker techniques used in health sciences. **Revista Brasileira Ciências da Saúde**, v.10, n.2, p.177-188, 2006.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 299-306, 2001.

CRUZ, C. D. et al. Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2011. p. 620.

DOMINY, N. J.; SVENNING, J. C.; Li, W. H. Historical contingency in the evolution of primate color vision. **Journal of human evolution**, p. 4425-45, 2003.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2011.

EBBENN, A. M.; ETTORI, L. C. Conservação genética ex situ de *Esenbeckia leiocarpa*, *Myracrodruon urundeuva* e *Peltophorum dubium* em teste de progênies misto. **Revista Instituto Florestal**, v.13, n.2, p.201-211, 2001.

EISERHARDT, W. L. et al. Geographical ecology of the palms (Arecaceae): determinants of diversity and distributions across spatial scales. *Annals of Botany*. p. 1-26, 2011.

ESFAHANI, S.T.; SHIRAN, B.; BALALI, G. AFLP markers for the assessment of genetic diversity in european and North American potato varieties cultivated in Iran. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, n.1, p. 75-86, 2009.

ESTOPA, R. A. et al. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Scientia Forestalis**, n. 70, p. 97-106, 2006.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology, Oxford**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

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

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics, Austin**, v. 164, n. 4, p. 1567-1587, 2003.

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

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

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

GOMES, L. R. P. et al. Genetic diversity in natural populations of Buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 11, p. 216-223, 2011.

GOMES, R. P. Diversidade e estrutura genética em populações de buriti (*Mauritia flexuosa* L. F.) com base nos marcadores moleculares AFLP. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, p. 55. Manaus: 2009.

HENDERSON, A. ET AL. Flowering phenology of a palm community in a central Amazon Forest. **Brittonia** v. 52, p. 149-159, 2000.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. Palms of Americas. Princeton University Press. New Jersey: 1995.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature**, v. 316, p. 76-79, 1985.

JONHS, M.A. et al. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. **CropScience**, v.37, p.605-613, 1997.

KAGEYAMA, P. Y. et al. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**, v. 12, n. 32, p. 65-70, 1998.

KAHN, F. The genus *Astrocaryum* (Arecaceae). Las palmeras en América del Sur. **Revista Peruana de Biología**, v. 15 (supl. 1), p. 29, 2008.

KAHN, F.; CASTRO, A. The palm community in a forest of central Amazonia, Brazil. **Biotropica**, v. 17, p. 2010-2016, 1985.

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

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

KARP, A.; SEBERG, O.; BUIATTI, M. Molecular Techniques in the Assessment of Botanical Diversity. **Annals of Botany**, v. 78, n.2, p.143-149, 1996.

KOSKELA, J.; AMARAL, W. A. N. Conservation of tropical forest genetic resources: IPGRI's efforts and experiences. In: Asian Moving Workshop on Conservation, Management and Utilization of Forest Genetics Resources. Thailand. 2002.

KÜCHMEISTER, H. et al. A polinização e sua relação com a termogênese em espécies de Arecaceae e Annonaceae da Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 28 (3), p. 217-245, 1998.

LEITMAN, P. et al. Arecaceae. In: Lista de espécies da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite re-vealed by in vitro amplification of adinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Society of Human Genetics**, V. 44, p. 388-396, 1989.

LOPES, M.S. et al. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v.5, n.29, p.56-60, 2002.

LOPES, R. et al. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP): aspectos técnicos e interpretação genética. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 64-68, 2003.

LOPES, R. et al. Palmeiras nativas do Brasil. Brasília: Embrapa, 2015. p. 432.

LORENZI, H. et al. Palmeiras brasileiras exóticas e cultivadas. Nova Odessa, Instituto Plantarum, São Paulo: 2004.

MACÍA, M. J. et al. Palm Uses in North-western South America: a Quantitative Review. **The Botanical Review**, v. 77, p. 462-570, 2011.

MACIEL, K. M. F. et al. Estudo da viabilidade técnica da fibra do tucumã-i (*Astrocaryum acaule*) para Produção têxtil. In: XXVIII Encontro Nacional de Engenharia de Produção. Rio de Janeiro: 2008.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer research, Philadelphia**, v. 27, n. 2, Part 1, p. 209-220, 1967.

MIRANDA, I. P. A. et al. Frutos e Palmeiras da Amazônia. Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Manaus: 2001.

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

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

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

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.

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

OKSANEN, J. et al. Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-10. 2013. There is no corresponding record for this reference, 2015.

OLIVEIRA, A. C. B. et al. Aplicação técnica de marcadores moleculares no melhoramento de plantas. Campinas: Instituto Agrônômico, Documentos IAC, 81, p 17. 2007.

OLIVEIRA, L. D. S. et al. Genetic diversity and structure of *Astrocaryum jauari* (Mart.) palm in two Amazon river basins. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 14, p. 166-173, 2014.

OLIVEIRA, P. R. D. et al. Análise da diversidade genética por AFLP e identificação de marcadores associados à resistência a doenças em videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27 n. 3, 2005.

PACHECO, K. M. M. P. et al. Oportunidades e limitações do uso da fibra natural de tucumã-i (*Astrocaryum acaule*) para a gestão e desenvolvimento de produtos semi-industriais. In: 8º Congresso Brasileiro de Gestão de Desenvolvimento de Produto. Porto Alegre: 2011.

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

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR- based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical Applied Genetic**, v. 85, n. 9, p. 985-993, 1993.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537-2539, 2012.

PEAKKAL, R. et al. Comparative genetic study confirms exceptionally low genetic variation in the ancient and endangered relictual conifer, *Wollenia nobilis* (Araucariaceae). **Molecular Ecology**, v. 12, p. 2331-2343, 2003.

PERES, C. A. Composition, density, and fruiting phenology of arborescent palms in an Amazonian Terra Firme Forest. **Biotropica**, v. 26, p. 285-294, 1994.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Disponível em: < <http://www.r-project.org> >. Acesso em: 10 jun. 2016.

RAMOS, S. L. F. et al. Microsatellite loci for tucumã of Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) and amplification in other Arecaceae. **American Journal of Botany**, p 508–510, 2012.

RODRIGUES, M. G. F. Caracterização genética de seleções irradiadas de figueira por marcadores moleculares (RAPD e AFLP). Tese. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias; 2001. p. 48.

ROSSI, F. S.; ROSSI, A. A. B.; DARDENGO, J. F. E.; BRAUWERS, L. R.; SILVA, M. L.; SEBBENN, A. M. Diversidade genética em populações naturais de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) com uso de marcadores ISSR. **Scientia Forestalis**, v. 42, n. 104, p. 631-639, 2014.

SLATKIN, M.; BARTON, N. H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution**, v. 43, p. 1349-1368, 1989.

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

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. A. Mathematical model of communication. Urbana: University of Illinois Press, 1949. p. 125.

SMITH, N. *Astrocaryum acaule*. In: Palms and People in the Amazon. Springer International Publishing. 2015. p. 29-32.

SOUZA, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: Nass, L.L.; Valois, A.C.C.; Mello, I.S.; Valadares-Inglis, M.C. (Ed.) Recursos genéticos e melhoramento de plantas. Rondonópolis: Fundação MT, p.939-965, 2001.

SOUZA, H. M. et al. Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas. São Paulo: Instituto Plantarum, 2004.

SOUZA, M. I. F. Análise da diversidade genética de populações de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze utilizando marcador AFLP. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, p.111, 2006.

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

SPRUELL, P. et al. Conservation genetics of bull trout: Geographic distribution of variation at microsatellite loci. **Conservation Genetics**, v. 4, p. 17-19, 2003.

SULLIVAN, S.; KONSTANT, T. L.; CUNNINGHAM, A. B. The impact utilization of palm on the population structure of the vegetable Ivory Palm (*Hyphaene petersiana*, Arecaceae) in North-Central Namibia. **Economic Botany**, v. 49, p. 357-370, 1995.

TERBORGH, J. Keystone Plant Resources In The Tropical Forest. In Conservation Biology, The Science Of Scarcity And Diversity (Ed. M. E. Soule), p. 330-344. Sinauer, Sunderland, Ma, Usa, 1986.

VIANA, J. M. S. et al. Efficacy of population structure analysis with breeding populations and inbred lines. **Genetica**, v. 141, n. 7-9, p. 389-399, 2013.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WALLACE, A. R. Palmeiras da Amazônia e seus usos. Manaus: Edua, 2014. p. 168.

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

WILLIAMS J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531–6535, 1990.

YANG, W. et al. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. **Journal of animal science and biotechnology**, v.4, n.1, p.2, 2013.

YEH, F. C.; YANG, R. C.; BOYLE, T. Popgene version 1.32. Microsoft windows – based freeware for population genetic analysis. Edmonton: University of Alberta, 1999. p. 300.

ZONA, A.; HENDERSON, A. A review of animal-mediated seed dispersal of palms. **Selbyana**, v. 11, p. 6-21, 1989.

ANEXO

Anexo 1: Coordenadas geográficas das subamostras utilizadas para o estudo de diversidade genética.

Coordenadas Geográficas						
Nº	UFAM		RDS Tupé		Tarumã-Açu	
	Latitude	Longitude	Latitude	Longitude	Latitude	Longitude
1	-03 05' 44,72"	-59 58' 31,72"	-02 59' 05,36"	-60 11' 52,19"	-02 53' 24,2"	-60 05' 53,4"
2	-03 05' 42,19"	-59 58' 34,77"	-02 59' 05,49"	-60 11' 50,48"	-02 53' 25,4"	-60 05' 53,6"
3	-03 05' 41,88"	-59 58' 33,80"	-02 58' 43,24"	-60 11' 30,05"	-02 53' 23,7"	-60 05' 54,4"
4	-03 05' 42,20"	-59 58' 33,30"	-02 58' 43,64"	-60 11' 31,36"	-02 53' 23,6"	-60 05' 55,6"
5	-03 05' 42,64"	-59 58' 32,87"	-02 59' 05,52"	-60 11' 52,17"	-02 53' 23,0"	-60 05' 56,7"
6	-03 05' 42,02"	-59 58' 36,33"	-02 59' 53,90"	-60 13' 13,14"	-02 53' 23,7"	-60 05' 57,3"
7	-03 05' 42,19"	-59 58' 35,22"	-02 59' 26,40"	-60 13' 28,24"	-02 53' 23,9"	-60 05' 53,8"
8	-03 05' 41,74"	-59 58' 38,19"	-02 59' 26,08"	-60 13' 27,94"	-02 53' 23,5"	-60 05' 58,7"
9	-03 05' 42,07"	-59 58' 35,88"	-02 59' 26,42"	-60 13' 28,40"	-02 53' 23,4"	-60 05' 59,2"
10	-03 05' 43,27"	-59 58' 31,58"	-03 00' 25,13"	-60 12' 54,22"	-02 53' 23,1"	-60 05' 59,5"
11	-03 05' 43,02"	-59 58' 31,91"	-03 00' 24,82"	-60 12' 53,82"	-02 53' 24,8"	-60 05' 58,6"
12	-03 05' 44,03"	-59 58' 31,33"	-03 00' 18,22"	-60 12' 54,02"	-02 53' 25,2"	-60 05' 58,7"
13	-03 05' 43,56"	-59 58' 31,56"	-03 00' 20,68"	-60 12' 19,64"	-02 53' 24,2"	-60 05' 58,5"
14	-03 05' 42,67"	-59 58' 32,83"	-03 00' 26,21"	-60 12' 38,53"	-02 53' 26,3"	-60 05' 57,6"
15	-03 05' 42,94"	-59 58' 32,16"	-03 00' 24,68"	-60 12' 46,43"	-02 53' 26,9"	-60 05' 56,9"
16	-03 05' 42,18"	-59 58' 33,30"	-03 00' 23,87"	-60 12' 51,36"	-02 53' 27,7"	-60 05' 57,0"
17	-03 05' 56,17"	-59 58' 12,98"	-03 00' 02,47"	-60 13' 06,60"	-02 53' 28,2"	-60 05' 56,5"
18	-03 05' 56,79"	-59 58' 11,51"	-02 59' 53,90"	-60 13' 13,14"	-02 53' 28,9"	-60 05' 56,2"
19	-03 05' 41,77"	-59 58' 37,10"	-02 59' 41,62"	-60 13' 22,68"	-02 53' 29,6"	-60 05' 54,8"
20	-03 05' 56,16"	-59 58' 11,41"	-02 59' 30,59"	-60 13' 30,91"	-02 53' 30,1"	-60 05' 51,1"
21	-03 05' 43,79"	-59 58' 32,18"	-02 59' 26,58"	-60 13' 28,11"	-02 53' 30,3"	-60 05' 53,9"
22	-03 05' 55,92"	-59 58' 15,21"	-02 59' 26,40"	-60 13' 28,24"	-02 53' 30,8"	-60 05' 53,4"
23	-03 05' 55,75"	-59 58' 13,25"	-03 00' 25,10"	-60 12' 54,20"	-02 53' 29,0"	-60 05' 53,3"
24	-03 05' 42,65"	-59 58' 34,18"	-03 00' 25,14"	-60 12' 54,20"	-02 53' 28,8"	-60 05' 52,7"
25	-03 05' 43,45"	-59 58' 32,12"	-03 00' 25,05"	-60 12' 54,20"	-02 53' 30,2"	-60 05' 52,6"
26	-03 05' 41,74"	-59 58' 38,19"	-03 00' 25,28"	-60 12' 54,49"	-02 53' 30,7"	-60 05' 52,7"
27	-03 05' 41,97"	-59 58' 39,01"	-03 00' 25,24"	-60 12' 54,67"	-02 53' 30,6"	-60 05' 54,5"
28	-03 05' 56,58"	-59 58' 11,88"	-03 00' 24,82"	-60 12' 53,82"	-02 53' 30,8"	-60 05' 54,1"
29	-03 05' 55,80"	-59 58' 14,12"	-03 00' 18,17"	-60 12' 53,56"	-02 53' 32,0"	-60 05' 52,5"
30	-03 05' 56,20"	-59 58' 12,68"	-03 00' 20,68"	-60 12' 19,64"	-02 53' 27,7"	-60 05' 52,9"