



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGROPECUÁRIA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMBRAPA**

ILENILCE CASTRO DA SILVA

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE MATRIZES DE TUCUMANZEIROS
SELECIONADAS PARA A PRODUÇÃO DE FRUTOS E TEOR DE ÓLEO NA
POLPA POR MARCADORES ISSR E SSR**

**BELÉM
2015**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGROPECUÁRIA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMBRAPA**

ILENILCE CASTRO DA SILVA

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE MATRIZES DE TUCUMANZEIROS
SELECIONADAS PARA A PRODUÇÃO DE FRUTOS E TEOR DE ÓLEO NA
POLPA POR MARCADORES ISSR E SSR**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da
Amazônia, como parte das exigências do Curso de
Mestrado em Biotecnologia Aplicada À Agropecuária
Área de Concentração: Caracterização Molecular
Vegetal, para obtenção do título de Mestre.**

**Orientadora: Prof. Dra. Maria do Socorro Padilha de
Oliveira**

Coorientadora: Prof. Dra. Elisa Ferreira Moura Cunha

BELÉM

2015

Silva, Ilenilce Castro da

Divergência genética entre matrizes de tucumanzeiros selecionadas para a produção de fruto e teor de óleo por marcadores ISSR e SSR. / Ilenilce Castro da Silva. - Belém, 2015.

63 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia aplicada a agropecuária) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2015.

Orientador: Maria do Socorro Padilha de Oliveira

1. Tucumanzeiros – Divergência – Selecionadas 2. *Astrocaryum vulgare* Mart. – Variabilidade 3. PCR 4. ISSR – marcador 5. SSR – marcador 6. Fruto - produção 7. Óleo - teor I. Oliveria, Maria do Socorro Padilha de (Orient.) II. Título

CDD 581.35845



Embrapa

Amazônia Oriental

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGROPECUÁRIA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMBRAPA**

ILENILCE CASTRO DA SILVA

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE MATRIZES DE TUCUMANZEIROS
SELECIONADAS PARA A PRODUÇÃO DE FRUTOS E TEOR DE ÓLEO NA
POLPA POR MARCADORES ISSR E SSR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Biotecnologia aplicada À Agropecuária: Área de Concentração Caracterização Molecular Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Maria do Socorro Padilha de Oliveira – Orientadora
Embrapa Amazônia Oriental

Dra. Ilmarina Campos de Menezes – 1º Examinador

Embrapa Amazônia Oriental

Dra. Maria Rosa Travassos da Rosa Costa – 2º Examinador
Embrapa Amazônia Oriental

Dra. Simone de Miranda Rodrigues – 3º Examinador
Embrapa Amazônia Oriental

Dedico esta grande conquista á minha família...

À minha mãe Ilenilde Castro, maior incentivadora, pelo apoio, suporte incondicional, exemplo de dedicação, mas principalmente pelo amor.

Ao meu pai Lucivaldo Silva, meu grande esteio, por estar ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

À minha segunda mãe, Maria do Rosário Carneiro, pelo exemplo de vida, dedicação e grande amor.

Que o Senhor sempre ilumine seus caminhos!

OFEREÇO

Ao meu irmão e amigo, Augusto, meu sobrinho Ícaro Augusto,
presente de Deus em minha vida.

Ao meu noivo, Rauny, pelo imenso amor, compreensão e dedicação.
À minha madrinha, Maria de Fátima Brito, pela motivação e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo sopro de vida, por nunca me desamparar e por sempre demonstrar que posso ir muito mais além.

À Embrapa Amazônia Oriental, pela oportunidade da realização de todas as etapas da pesquisa e por adquirir novos conhecimentos.

À FINEP e à FAPESPA, agências financiadoras dos projetos “Pesquisa, desenvolvimento e inovação (P, D & I) em palmáceas para a produção de óleo e aproveitamento econômico de coprodutos e resíduos – PROPALMA” e “Tucumã-do-Pará: Estratégias agronômicas e genéticas para sua viabilidade como matéria prima na produção de Biodiesel” pelo apoio financeiro de todas as atividades desenvolvidas.

Ao Programa de Mestrado em Biotecnologia Aplicada À Agropecuária, pela oferta do curso.

À Dra. Maria do Socorro Padilha, pela orientação, pelos grandes ensinamentos, paciência, preocupação e superação.

À Dra. Elisa Cunha, pela coorientação e ensinamentos em desenvolvimentos de marcadores moleculares.

Ao Professor Dr. Reginaldo Alves, por sempre acreditar e fazer os seus alunos serem pessoas melhores, e pelo exemplo de profissional na área acadêmica.

Aos técnicos do Laboratório de Genética – LABGEN, Izaías Leite, Pedro Pinheiro, Anderson Sousa e Leonária Silva pelo grande apoio, ajuda e amizade.

Aos meus colegas, que se tornaram amigos, Francisca Chagas, Hellen Oliveira, Lígia Cristine Pontes, Ângela Maria de Sousa, Sidney Vasconcelos e Bruna Alves.

Aos grandes amigos e colegas de profissão, Andréa Fortes, Caio Silva e Alan Nahon que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e me guiando na trajetória do curso.

Às minhas amigas Luany Paraense e Adriana Teixeira, pela paciência, parceria e companheirismo durante e depois do curso.

Aos meus amigos da graduação Bárbara Rebeca das Neves, José Ailton de Melo Jr, Adrielle Kamilla Batista e Thais Rose por contribuírem para minha evolução.

À minha tia Joana D’arc Paes, pelo incentivo, carinho e exemplo.

Aos meus professores Maria de Nazareth Silva, Ruy Silva e Maria Lúcia, por se dedicarem com tanto carinho a trilhar meu caminho e a alcançar meus objetivos.

Às minhas professoras Cídia Costa, Maria Leonor Martins, Maria Amélia e Rosa Santa Rosa, por contribuírem na minha trajetória do ensino médio à graduação.

Ao casal Thelma Araújo e José Henrique Araújo, pela gratidão, apoio e carinho.

“Se tiverdes fé como um grão de mostarda, direis a esta amoreira: Arranca-te e transplanta-te no mar; e ela vos obedecerá”

(Lucas 17.6)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Perfis de géis de agarose contendo produtos de amplificação dos *primers* ISSR da UBC 835, 840, 841, 872, 881, 884 em suas temperaturas de anelamento ótimas, 55°C, 45°C, 54°C, 45°C, 53°C e 54°C, utilizando DNA de quatro genótipos de *A. vulgare* (indivíduos 1, 2, 3 e 4).....26
- Figura 3.1 - Perfil de amplificação em gel de agarose a 1,5% do *primer* UBC 835 nas 29 matrizes de tucumazeiro selecionadas para a produção de frutos.....39
- Figura 3.2 - Dendrograma gerado a partir das similaridades genéticas obtidas pelo coeficiente de Jaccard entre os genomas das 29 matrizes de tucumã-do-pará, selecionadas para a produção de frutos, com base nas 87 bandas obtidas por 16 *primers* ISSR.....40
- Figura 3.3 - Dendrograma gerado a partir das similaridades genéticas obtidas pelo coeficiente de Jaccard entre os genomas das 29 matrizes de tucumã-do-pará, selecionadas para teor de óleo na polpa, com base nas 87 bandas obtidas por 16 *primers* ISSR.....42
- Figura 4.1 - Perfil de gel desnaturante de poliacrilamida com loco *mBg* 55 nas 29 matrizes de *A. vulgare* selecionadas para teor de óleo na polpa.....54
- Figura 4.2 - Dendrograma gerado a partir das similaridades genéticas obtidas pelo coeficiente de Jaccard entre os genomas das 29 matrizes de tucumã-do-pará, selecionadas para produção de frutos, com base em seis locos SSR.....55
- Figura 4.3 - Dendrograma gerado a partir das similaridades genéticas obtidas pelo coeficiente de Jaccard entre os genomas das 29 matrizes de tucumã-do-pará, selecionadas para teor de óleo na polpa, com base nos seis locos SSR.....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Identificação dos 29 <i>primers</i> ISSR pré-selecionados após a amplificação de DNA de <i>Astrocaryum vulgare</i> na temperatura de anelamento de 47°C e suas sequências.	25
Tabela 2.2 - Identificação dos 19 <i>primers</i> ISSR selecionados para <i>Astrocaryum vulgare</i> com as temperaturas de anelamento (Ta) mais adequadas.	25
Tabela 3.1 - Identificação das 52 matrizes de tucumã-do-Pará sendo 29 selecionadas para produção de fruto e 29 para teor de óleo.....	35
Tabela 3.2 – Identificação dos 19 <i>Primers</i> ISSR selecionados para <i>Astrocaryum vulgare</i> e suas temperaturas de anelamento.....	36
Tabela 3.3 - Total de bandas, de bandas polimórficas e porcentagem de polimorfismo gerado pelos 16 <i>primers</i> ISSR aplicados no grupo de matrizes de tucumanzeiro selecionadas para produção de frutos.....	39
Tabela 3.4 - Total de bandas, de bandas polimórficas e da porcentagem de polimorfismo gerado pelos 16 <i>primers</i> ISSR no grupo das 29 matrizes de tucumanzeiro selecionadas para teor de óleo na polpa.....	41
Tabela 3.5 - Estimativa de variabilidade genética nos dois grupos de matrizes selecionadas de <i>A. vulgare</i> por marcadores ISSR.....	43
Tabela 3.6 - Análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro dos dois grupos de matrizes de tucumanzeiro (<i>A. vulgare</i>) com base em 87 marcadores ISSR.....	44
Tabela 4.1 - Identificação dos 12 locos microssatélites desenvolvidos para <i>A. aculeatum</i> transferíveis para <i>A. vulgare</i>	52
Tabela 4.2 - Tamanho da amostra, número de alelos, número médio de alelos por loco e porcentagem de locos polimórficos nos dois grupos de matrizes de tucumanzeiro (<i>A.vulgare</i> Mart.) com base em seis locos microssatélites.....	54

Tabela 4.3 - Estimativa da variabilidade genética em dois grupos de matrizes de tucumazeiro (*A. vulgare*) selecionadas para produção de frutos e teor de óleo na polpa, utilizando seis locos SSR.....57

Tabela 4.4 - Análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro de dois grupos de matrizes de tucumazeiro (*A. vulgare*) com base em sete locos SSR.....58

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 CONTEXTUALIZAÇÃO	14
1.1 HIPÓTESE	16
1.2 OBJETIVO GERAL	16
1.2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
REFERÊNCIAS	18
2 Seleção de primers ISSR para aplicação em genomas de tucumanzeiros (Astrocaryum vulgare Mart.)	20
RESUMO	20
ABSTRACT	21
2.1 INTRODUÇÃO	22
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	23
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
2.4 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29
3 Divergência genética entre matrizes de tucumanzeiros (Astrocaryum vulgare Mart.) selecionadas para produção de frutos e teor de óleo na polpa por marcadores ISSR	31
RESUMO	31
ABSTRACT	32
3.1 INTRODUÇÃO	33
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
3.4 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45
4 Divergência genética entre matrizes de tucumanzeiros (Astrocaryum vulgare Mart.) selecionadas para produção de frutos e teor de óleo na polpa por marcadores SSR	48
RESUMO	48
ABSTRACT	49
4.1 INTRODUÇÃO	50
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	51

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.4 CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
CONCLUSÕES GERAIS.....	63

RESUMO

O tucumanzeiro (*Astrocaryum vulgare* Mart.) é considerado uma fonte promissora de matéria prima para produção de biodiesel, por causar menos impacto ambiental que os derivados do petróleo. O presente trabalho teve por objetivo quantificar a divergência genética entre matrizes de tucumanzeiro selecionadas para produção de frutos e teor de óleo na polpa por meio de marcadores ISSR e SSR. Para isso foi realizada, primeiramente, a extração e quantificação de DNA's dos folíolos de 52 matrizes do BAG-Tucumã. Para a seleção dos *primers* ISSR foram utilizadas quatro amostras de DNA escolhidas ao acaso e 100 *primers* ISSR da UBC a temperatura de anelamento de 47°C para verificar a amplificação. Entre os 100 *primers* ISSR avaliados 29 foram pré-selecionados e submetidos a novas PCR's com diferentes temperaturas de anelamento (44°C à 55°C) para selecionar os *primers* pela nitidez das bandas. Desse total foram selecionados 19 *primers* ISSR que amplificaram bandas nítidas em Ta variando de 44°C (UBC 859) a 55°C (UBC 879 e UBC 890). Após esse processo, as 52 amostras de DNA, sendo 29 selecionadas para produção de frutos e 29 para teor de óleo na polpa, onde seis amostras se repetem nos dois grupos, foram genotipadas com base nos 19 *primers* ISSR, 12 locos SSR desenvolvidos para *Astrocaryum aculeatum* e oito locos desenvolvidos para *Bactris gasipaes*. Após as genotipagens foram obtidas as estimativas de dissimilaridade, heterozigosidade e análise de variância molecular realizadas pelos programas NTSYS e GenAlex. Os resultados demonstraram que os dezesseis iniciadores ISSR geraram 87 bandas e formação de pelo menos dois grupos formados pelo dendrograma para as duas seleções, a análise de variância molecular demonstrou que 98% da variação detectada se encontra dentro dos grupos e 2% entre os grupos. Dos vinte locos SSR aplicados, seis demonstraram boa amplificação gerando ao todo 24 alelos com média de 3,6 alelos por loco e formação de pelo menos dois grupos gerados pelo dendrograma para as duas seleções. A análise molecular demonstrou que 73,22% da variância detectada se encontra dentro dos grupos e apenas 26,78% entre os grupos, o fluxo gênico demonstrou um alto valor igual a 3,382 indicando grande movimentação de genes entre as matrizes dos grupos. Os resultados indicam que a seleção intrapopulação é mais adequada para estudos de melhoramento em *A. vulgare*.

Palavras-chave: Amazônia. Arecaceae. *Astrocaryum vulgare*. Marcadores moleculares. Polimorfismo. Variabilidade genética.

ABSTRACT

The fiber palm tree (*Astrocaryum vulgare* Mart.) is considered a promising source of raw material for biodiesel production, to cause less environmental impact than petroleum. This study aimed to quantify the genetic divergence between matrices fiber palm tree selected for fruit production and oil content in the pulp through ISSR and SSR markers. For it was held, first, extraction and quantification of DNA's of 52 leaflets headquarters BAG-Tucumã. To select the ISSR primers were used four DNA samples chosen at random and 100 ISSR primers UBC to 47 ° C annealing temperature to verify amplification. Among the 100 evaluated 29 ISSR primers were pre-selected and subjected to further PCR's with different annealing temperatures (44 ° C to 55 ° C) to select the primers by the sharpness of the bands. Of these 19 were selected ISSR primers which amplified clear bands in Ta ranging from 44 ° C (UBC 859) at 55 ° C (879 UBC and UBC 890). After this process, the 52 DNA samples, 29 selected for fruit production and 29 for oil content in the pulp, where six samples are repeated in both groups were genotyped based on 19 ISSR primers, 12 SSR loci developed for *Astrocaryum aculeatum* eight loci developed for *Bactris gasipaes*. After genotyping were obtained estimates of dissimilarity, heterozygosity and analysis of molecular variance performed by NTSYS and GenAlex programs. The results showed that the sixteen ISSR primers produced 87 bands and forming at least two groups formed by dendrogram for the two selections, the analysis of molecular variance showed that 98% of the detected variation is within the groups and 2% between groups. Twenty applied SSR loci, six showed good amplification generating a total of 24 alleles with an average of 3.6 alleles per locus and training of at least two groups generated by dendrogram for both teams. Molecular analysis showed that 73.22% of the variance is detected within the groups and only 26.78% between groups gene flow showed a high value of 3.382 indicating great movement of genes between the groups of arrays. The results indicate that the selection intrapopulação is more suitable for improvement in *A. vulgare* studies.

Keywords: Amazon; Arecaceae; *Astrocaryum vulgare*; Molecular markers; Polymorphism; Genetic variability;

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O tucumanzeiro, *Astrocaryum vulgare* Mart., palmeira da tribo Cocoeae, conhecida também como tucumã, tucum, tucumã-do-pará e aouara, é uma espécie oleaginosa e nativa da América do Sul, Guiana Francesa e Suriname (CAVALCANTE, 1991). Essa espécie perene é monóica, possui caule múltiplo e espinhos pretos de tamanhos variáveis por quase toda a extensão da planta (OLIVEIRA et al., 2012), com altura variando de 8 a 10 m. Seus frutos possuem forma ovoide, do tipo drupa e de coloração variável indo do amarelo ao vermelho e sua polpa, com espessura de alguns milímetros, tem característica oleosa com gosto doce, odor característico, mesocarpo fibro-carnoso considerado comestível (PESCE, 2009). A polpa é bastante nutritiva com elevadas quantidades de provitamina A “betacaroteno”, fonte também de vitaminas B₁ e C, proteínas e excelente fonte calórica. Sua inflorescência tem as flores unissexuais, onde as femininas possuem um número mais elevado e são protegidas por uma espata denso-espinhosa (CAVALCANTE, 2010)

Essa palmeira pode ser encontrada em pastos, capoeiras e florestas, e se desenvolve bem em solos pobres de terra firme em forma de manchas (SHANLEY; MEDINA, 2005). Na floresta, é esporadicamente encontrada em pequenas densidades, ao contrário das áreas desmatadas onde possui grande abundância e ocorrência espontânea, dispostas em densas manchas em roçados, pastagens e margens de estradas com cerca de 50 indivíduos por hectare (CAVALCANTE, 1991; MIRANDA et al., 2001; LORENZI et al., 2004)

Tem grande importância social e econômica nas localidades onde ocorre naturalmente, pois todas as partes da planta são úteis a comercialização. Para Shanley e Medina (2005) o tucumã possui muitas utilidades sendo a polpa usada na fabricação de “vinho”, sorvete, picolé, e sabão. Além disso, a partir do caroço e dos espinhos são produzidas biojóias, e as folhas podem ser utilizadas na fabricação de redes de pesca, cestas e cordas. Bora (2001) relata que do fruto se extrai o óleo da polpa e o óleo da amêndoa, que possuem cor alaranjada com consistência líquida, sendo grandes fontes de ácidos graxos, ômega 3, 6 e 9. Mesmo com toda essa potencialidade, esta espécie ainda tem sido pouco estudada, apresentando carência de informações que possam levá-la ao grau de planta domesticada.

Na Amazônia, essa palmeira vem ganhando destaque como fonte promissora de matéria prima à produção de biodiesel. Contudo, informações agrônômicas que possam viabilizar o cultivo racional dessa espécie são raras ou inexistentes, principalmente sobre variabilidade de germoplasma que possam subsidiar programas de melhoramento genético.

A preocupação com a sustentabilidade global é um dos assuntos mais discutidos no mundo, devido aos efeitos negativos ao meio ambiente e a humanidade ocasionados pela queima exaustiva de combustíveis fósseis não renováveis, que emitem altos índices de poluentes (PEUKER; FAGUNDES, 2002). Além disso, há previsões de que os combustíveis fósseis estejam chegando ao fim, o que tem levado a procura de novas alternativas que sejam biodegradáveis e que minimizem os efeitos das emissões de gases poluentes. Dentre estas alternativas, tem-se o biodiesel visto como um grande aliado da sustentabilidade (GHASSAN, 2003), por ser capaz de atender à maioria da frota de veículos a diesel existente no mercado (LAURINDO, 2003). Assim, a busca por plantas oleaginosas com potencial para a produção de biodiesel se faz necessária.

Na domesticação de uma espécie, uma etapa essencial é a coleta de material propagativo para a instalação de Banco de Germoplasma, pois estudos básicos sobre o material conservado são essenciais para subsidiar programas de melhoramento genético (VILLELA-MORALES et al., 1997). Para o tucumã, durante a década de 80 foram realizadas as primeiras coletas para a formação do BAG – Tucumã da Embrapa Amazônia Oriental em vários locais (LIMA; COSTA, 1991). Nesse banco foram selecionadas matrizes com alta produção de frutos e, mais recentemente, matrizes com alto teor de óleo na polpa. Entretanto, não se tem informações se esses dois grupos de matrizes podem ser usados como populações básicas para iniciar um programa de melhoramento genético, principalmente quanto à variabilidade intragrupo e a divergência intergrupo.

Estudos envolvendo a quantificação da divergência genética em tucumanzeiro, apesar de serem de grande importância, na literatura, tem-se apenas um estudo enquadrado nesse assunto, com uso de marcadores RAPD demonstrando a variabilidade genética em *A. vulgare* (OLIVEIRA et al., 2012).

A divergência genética é destinada a identificar combinações híbridas de maior efeito heterótico em maior heterozigose e grupos de progenitores que resultem em gerações com maior segregação em recombinantes, além da possibilidade de recuperar genótipos superiores (CRUZ et al., 2004), e pode ser quantificada por vários

marcadores, dentre eles os morfológicos, os agrônômicos, os bioquímicos, os citológicos e os moleculares. Os marcadores moleculares se tornaram uma grande ferramenta, pois são capazes de distinguir genótipos morfológicamente similares e geneticamente aparentados (TOPPA; JADOSKI, 2013), usando a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). O surgimento dessa técnica permitiu o desenvolvimento de uma nova classe de marcadores, dentre eles o ISSR e o SSR.

Os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) são baseados em microssatélites, não exigindo conhecimento prévio da sequência de DNA, e são marcadores dominante (ZIETJIEWICZ et al., 1994). Por serem, degenerados e considerados semi arbitrários de alta reprodutibilidade, podem ser utilizados com sucesso em estudos de diversidade e divergência genética (TSUMURA et al., 1996; LIU; WENDEL, 2001; REDY et al., 2002). Pelo fato desses marcadores serem aleatórios e existirem um grande número deles disponíveis, há necessidade de identificar aqueles úteis para serem aplicados no genoma da espécie em foco.

Os marcadores microssatélites (*Simple Sequence Repeat*) são sequências repetidas em *tandem* de 2 a 6 nucleotídeos, que possuem boa distribuição no genoma (TAUTZ, 1989), apresentam como característica a codominância e são multialélicos, fornecendo alto conteúdo informativo, ocorrendo ao longo do genoma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; BUSO et al., 2003; MEDEIROS et al., 2006). Esses últimos marcadores são os mais indicados para estudos de estrutura genética de populações, além de serem utilizados para estudos de diversidade e divergência genética.

O presente estudo teve por objetivo utilizar marcadores ISSR e SSR como ferramenta na identificação e quantificação da divergência genética em matrizes de tucumanzeiro selecionadas para produção de frutos e teor de óleo na polpa.

1.1 HIPÓTESE

Matrizes de tucumanzeiros selecionadas para produção de fruto e teor de óleo apresentam divergência e variabilidade genética, que poderão ser confirmadas pela presença de polimorfismo, com base em marcadores ISSR e SSR. Para que possam ser usados como populações básicas em programas de melhoramento.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Quantificar a divergência genética entre matrizes de tucumanzeiro selecionadas para produção de frutos e teor de óleo na polpa por meio de marcadores ISSR e SSR.

1.2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Selecionar primers ISSR que amplifiquem e possuam nitidez de bandas para serem aplicados em genomas de tucumanzeiros.

b) Quantificar a dissimilaridade genética entre matrizes de tucumanzeiro selecionadas para produção de frutos e teor de óleo na polpa, quantificando a variabilidade intra e intergrupo, além de identificar as mais divergentes como subsídios ao programa de melhoramento dessa palmeira por meio de marcadores ISSR.

c) Quantificar a dissimilaridade genética entre matrizes de tucumanzeiro selecionadas para produção de frutos e teor de óleo na polpa, quantificando a variabilidade intra e intergrupo, além de identificar as mais divergentes como subsídios ao programa de melhoramento dessa palmeira por meio de marcadores SSR.

REFERÊNCIAS

- BORA, P. S.; NARAIN, N.; ROCHA, R. V. B. M.; MONTEIRO, A.C. O. ; MOREIRA, R . A. Caracterización de las Fracciones protéicas y lipídicas de pulpa y semillas de Tucuma (*Astrocaryum vulgare* Mart.). **Revistas Científicas de America Latina y El Caribe**. p.111-116. 2001.
- BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P. S.; BRONDANI, R. V. Marcadores microssatelites em especies vegetais – Desenvolvimento e caracterizacao de marcadores microssatelites em especies vegetais tropicais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, p. 46-50, 2003.
- CAVALCANTE, P.B. 1991. **Frutas Comestíveis da Amazônia**. 5. ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 279 p. 1991
- CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis na Amazônia**. 7 ed. Belém: CNPq/Museu Paraense Emílio Goeldi, 282 p. 2010.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. v. 1, 3 ed., 480p., Viçosa: UFV, 2004.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3º edição. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p. 1998.
- GHASSAN, T. A.; MOHAMAD I. AL-WIDYAN, B.; ALI O, A. Combustion performance and emissions of ethyl ester of a waste vegetable oil in a water-cooled furnace. **Appl. Thermal Eng.**, v.23, p.285-293, 2003.
- LAURINDO, J. C. Combustíveis alternativos no Tecpar e na UFPR. In: SEMINÁRIO PARANAENSE DE BIODIESEL, 1., 2003, Londrina. **Anais eletrônicos...** Disponível em: < <http://www.tecpar.br/cebio/Seminario-palestras.htm>> Acesso em: 23 de agosto de 2003.
- LIMA, R. R.; COSTA, J. P. C da. **Registro de introduções de plantas de cultura pré-colombiana coletadas na Amazônia Brasileira**. Belém: EMBRAPA-CPATU, 191 p. 1991.
- LIU, B.; WENDEL, J.F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 1 p. 205-208, 2001.
- LORENZI, H. et al. **Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 432 p. 2004.
- MEDEIROS, C. F. L.; CARDOSO, M. A.; FERREIRA, P. C. G. Uso de microssatélites em estudos de biologia da conservação. **Floresta e Ambiente**, v. 13, n. 2, p. 25 – 36, 2006.

MIRANDA, I. P. A. et al. **Frutos de Palmeiras da Amazônia**. Manaus: MCT INPA, 2001. 120 p.

OLIVEIRA, N. P. de; OLIVEIRA, M. do S. P. de; MOURA, E. F. Variabilidade e divergência genética entre genótipos de tucumanzeiro-do-Pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.) promissores para a produção de frutos por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 1, p. 216-226, 2012.

PEUKER, K.; FAGUNDES, L. **Primeiro inventário brasileiro de emissões antrópicas de gases de efeito estufa – emissões fugitivas da mineração e do tratamento de carvão mineral**. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2002.

PESCE, C. **Oleaginosas da Amazônia**. 2 ed., rev. e atual. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi; Brasília: Ministério do Desenvolvimento Agrário, 2009.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and application plant breeding. **Euphytica**, n. 128, p. 9-17, 2002.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. Belém: CIFOR, Imazon, 2005.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 16, p. 6463-6471, 1989.

TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis – SAP Mal. Cdo. Rondon**, v. 12, n. 1, jan-mar, p.1-5, 2013.

TSUMURA, Y.; OHBA, K.; STRAUSS, S. H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, n. 1, p. 40-45, 1996.

VILELA-MORALES, E. A.; VALOIS, A. C. C.; NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetales**. Brasília: CENARGEN, 78p. 1997.

ZIETJIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p. 176-183, 1994.

2 Seleção de primers ISSR para aplicação em genomas de tucumanzeiros (*Astrocaryum vulgare* Mart.)

RESUMO

Astrocaryum vulgare Mart. é uma palmeira nativa da Amazônia conhecida popularmente por tucumã-do-Pará. Seus frutos são utilizados nas agroindústrias, cosméticas e alimentícias, além de serem fontes promissoras de matéria prima para produção de biodiesel. Mas, a escassez de informações agrônômicas dificulta seu uso em programas de melhoramento. Objetivou-se selecionar *primers* ISSR para uso em genomas de tucumanzeiros. Foram coletadas amostras de folíolos de 52 matrizes de tucumanzeiro selecionadas no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental. Para a extração de DNA, foram quantificados em gel de agarose a 1 % com base em três concentrações de DNA Lambda. Para a realização das PCR's foram escolhidas, ao acaso, quatro amostras, nas quais foram aplicados 100 primers ISSR da UBC set nº 9, sendo todas testadas à temperatura de anelamento (T_a) de 47°C e, depois, a dois gradientes de temperatura de anelamento, a baixo e acima do padrão (47°C). Os produtos foram separados em gel de agarose a 1,5%, em eletroforese horizontal, corados com brometo de etídio, fotodocumentados e armazenados digitalmente. A seleção foi realizada com base na amplificação e na nitidez das bandas. Dos 100 *primers* avaliados, 29 amplificaram bandas a 47°C. Desse total 19 *primers* ISSR produziram bandas nítidas em T_a variando de 44°C a 55°C. Portanto os *primers* selecionados mostram-se capazes de amplificar produtos em genomas de *A. vulgare*, possibilitando a utilização em estudos de variabilidade, similaridade, diversidade e divergência genética.

Palavras-chave: Amplificação. Marcadores moleculares. Nitidez. Palmeira. Polimorfismo. Temperatura de anelamento.

ABSTRACT

Astrocaryum vulgare Mart. is an Amazonian native palm and popularly known as fiber palm tree. Its fruits are used in agribusiness, cosmetics and food, and are promising sources of raw materials for biodiesel production. But the lack of agronomic information hinders its use in breeding programs. The objective was to select ISSR primers for use in tucumanzeiros genomes. Leaflets samples were collected from 52 mothers of tucumanzeiro selected in the Active Germplasm Bank of Embrapa Amazônia Oriental. For DNA extraction were quantified on a 1% agarose gel based on three concentrations of Lambda DNA. To perform the PCR's were chosen at random four samples, in which they were applied 100 primers ISSR UBC September 9, all of which tested the annealing temperature (Ta) of 47 ° C and then the two temperature gradients annealing at low and above the standard (47°C). The products were separated on agarose gel at 1.5% by horizontal electrophoresis, stained with ethidium bromide, photodocumented and stored digitally. The selection was based on the amplification and the sharpness of the bands. Of the 100 primers evaluated, 29 amplified bands to 47°C. Of this total 19 ISSR primers produced clear bands in Ta ranging from 44 ° C to 55 ° C. Therefore, the selected primers shown to be capable of amplifying products *A. vulgare* genomes, allowing use in variability studies, similarity, diversity and genetic divergence.

Keywords: Amplification, Molecular markers, Sharpness, Palm Tree, Polymorphism, Annealing temperature.

2.1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui grande quantidade de espécies vegetais capaz de fornecer matéria prima para a produção de combustível renovável. Na região amazônica são encontradas várias espécies oleaginosas, utilizadas para vários fins, entre elas tem-se a produção de combustíveis e a indústria cosmética (PESCE, 2009). Nesse contexto está o tucumã-do-Pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.), espécie da família Arecaceae, cujo centro de dispersão encontra-se na Amazônia Oriental chegando a Guiana Francesa e ao Suriname (SHANLEY; MEDINA, 2005). Apesar de sua potencialidade como matéria prima na produção de biodiesel, pouco ou quase nada se tem de informações genéticas que possam subsidiar programas de melhoramento com vista a obter sementes de qualidade para atender plantios racionais, principalmente sobre a quantificação da variabilidade genética.

O uso de marcadores moleculares vem ganhando destaque na atualidade, pelo seu amplo potencial de uso no melhoramento genético e por serem capazes de acessar o genoma de uma espécie, minimizando o efeito ambiental e erros de identificação da espécie (BORBA et al., 2005). Ferreira e Grattapaglia (1998) descrevem esses marcadores como sendo segmentos de DNA, facilmente ligados a locos que determinam uma característica de interesse. Dentre os vários marcadores utilizáveis, tem-se os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), desenvolvidos por Gupta et al. (1994) e Zietkiewiz et al (1994) e que apresentam característica dominante. Seu desenvolvimento foi baseado nos microssatélites com produtos que correspondem a sequências de tamanhos variados flanqueando as regiões repetidas de microssatélites, iguais e orientadas em direções opostas que podem estar ancoradas na extremidade 5' ou 3' da fita de DNA.

Os marcadores ISSR são mais robustos do que os marcadores RAPD, pois apresentam maior superfície de ancoragem, devido ao tamanho do *primer* e por possuírem maiores temperaturas de reassociação, produzindo um aumento na reprodutibilidade dos produtos gerados (TSUMURA et al, 1996;). O resultado de sua amplificação, através da reação em cadeia da polimerase (PCR), provém de regiões localizadas entre dois locos SSRs, gerando um sistema de marcação multilocos útil para análise de diversidade (ZIETJIEWICZ et al., 1994; GODWIN et al., 1997).

Esses marcadores não necessitam do conhecimento prévio do material genético (LIU; WENDEL, 2001). São eficientes no que se refere à identificação de cultivares e

estimativa de parentesco através da análise do DNA em qualquer espécie apresentando resultados confiáveis e rapidez em seus resultados com custos relativamente menores comparados a outros tipos de marcadores. São muito utilizados em trabalhos com espécies pouco conhecidas, como o *A. vulgare*, pelo fato de não precisar do conhecimento prévio do material genético e da utilização de *primers* específicos, une as vantagens dos SSRs, o polimorfismo dos marcadores AFLP e a universalidade do RAPD (REDDY et al., 2002.), além de detectarem níveis de polimorfismo similares ou superiores comparados aos RFLP e RAPD (GODWIN et al., 1997). Portanto, devem também contribuir em programas de melhoramento genético vegetal, selecionando genótipos que futuramente podem ser utilizados como genitores de novas cultivares (COSTA, 2010; RODRIGUES, 2010). Entretanto, na literatura especializada não há relatos do uso desses marcadores em genomas de tucumã-do-pará.

Este trabalho teve como objetivo selecionar *primers* ISSR para uso em análises genéticas de genomas de tucumã-do-pará.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no laboratório de genética e biologia molecular da Embrapa Amazônia Oriental – Belém-PA. Foram selecionadas ao acaso quatro amostras de DNA genômico obtidas de matrizes selecionadas do Banco de Germoplasma de tucumã, BAG – Tucumã dessa Embrapa, as quais se encontram conservadas à -80 °C. As amostras de DNA foram quantificadas em gel de agarose a 1% pela comparação com o DNA do fago lambda nas concentrações de 50, 100 e 200 ng/ul⁻¹. Após essa etapa, as amostras foram diluídas para concentração de 10 ng/ul⁻¹ para serem utilizadas nas reações de PCR.

As PCR's (Reação em Cadeia da Polimerase) foram feitas com as quatro amostras de DNA aplicando 100 primers ISSR (801 a 900) da UBC (*University of British Columbia*) e realizadas em termociclador AB (Applied Biosystems). O mix teve volume final de 20 µL por amostra contendo: 8,18 µL de água mili-Q (ultra pura), 2,0 µL de Tampão (10 x PCR-MgCl₂), 2 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,38 µL de dNTPs (100 µl de cada dNTP e 600 µl H₂O mili-Q), 1,38 µL de BSA (2,5 mg/ml), 2,66 µL de *primer* (20 nmol), 0,2 µL de TAQ polimerase (5 U/µl) e 2 µL de DNA (10 ng). O programa de amplificação utilizado teve fase inicial de desnaturação a 94°C por 1,5 min, seguida de 40 ciclos nas seguintes condições: 40 s para desnaturação a 94°C; temperatura de

anelamento padronizada em 47°C; 2 min para extensão a 72°C. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 min.

Os produtos da amplificação foram aplicados em gel de agarose a 1,5 %, corados com brometo de etídio e revelados em eletroforese horizontal com tampão TBE 1X e Ladder de 1kb (Invitrogen), conduzida em 90 V por 1,5 h. Os perfis dos géis foram visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta, fotodocumentados e utilizados na avaliação. A análise dos produtos gerados foi feita visualmente, usando como critério de seleção a amplificação de bandas.

Os *primers* pré-selecionados foram submetidos a dois gradientes de temperatura de anelamento: 1) variando três graus abaixo de 47°C (44°C a 46°C), e 2) variando oito graus acima (48°C a 55°C), com vista a identificar a temperatura de anelamento mais adequada. Após as PCR's, os produtos obtidos foram revelados em eletroforese horizontal nas mesmas condições já descritas acima e, através dos perfis dos géis, foram selecionadas as melhores temperaturas para cada *primer* de acordo com a nitidez das bandas.

Foi contado o número de bandas produzidas em cada *primer* na temperatura de anelamento (T_a) escolhida, para a estimativa do número ótimo de bandas ISSR em genomas das matrizes desejáveis para frutos e óleo.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 100 *primers* ISSR testados, 29 foram escolhidos pelo critério de amplificação de bandas e constam na Tabela 2.1. Desse total, foram selecionados 19 *primers* com base na nitidez das bandas, os quais estão discriminados na Tabela 2.2. Os 19 primers amplificaram poucas bandas nas quatro amostras utilizadas, com média de bandas por *primer* igual a 1,13 (Tabela 2.3). Entre os *primers* selecionados, o UBC 890 e UBC 891 também foram selecionados para a espécie *Phoenix dactylifera* por Hamza et al (2013), pela sua capacidade de gerar padrões de bandas amplificadas de forma consistente e pela facilidade de avaliar polimorfismo. Para *A. vulgare*, esses iniciadores geraram um padrão de amplificação apropriado com bandas reprodutíveis e consistentes (Figura 2.1).

Tabela 2.1. Identificação dos 29 *primers* ISSR pré-selecionados após a amplificação de DNA de *Astrocaryum vulgare* na temperatura de anelamento de 47°C e suas sequências.

<i>Primer</i>	Sequência	<i>Primer</i>	Sequência	<i>Primer</i>	Sequência
UBC 815	(CT) ₈ G	UBC 853	(TC) ₈ RT	UBC 879	(CTTCA) ₃
UBC 817	(CA) ₈ ^a	UBC 855	(AC) ₈ YT	UBC 881	(AT) ₈ YA
UBC 818	(CA) ₈ G	UBC 856	(AC) ₈ YA	UBC 884	HBH(AG) ₇
UBC 835	(AG) ₈ YC	UBC 857	(AC) ₈ YG	UBC 885	BHB(GA) ₇
UBC 840	(GA) ₈ YT	UBC 858	(TG) ₈ RT	UBC 886	VDV(CT) ₇
UBC 841	(GA) ₈ YC	UBC 859	(TG) ₈ RC	UBC 887	DVD(TC) ₇
UBC 846	(CA) ₈ RT	UBC 864	(ATG) ₆	UBC 889	DBD(AC) ₇
UBC 847	(CA) ₈ RC	UBC 865	(CCG) ₆	UBC 890	VHV(GT) ₇
UBC 848	(CA) ₈ RG	UBC 868	(GAA) ₆	UBC 891	HVH(TG) ₇
UBC 852	(TC) ₈ RA	UBC 872	(GATA) ₄		

Tabela 2.2. Identificação dos 19 *primers* ISSR selecionados para *Astrocaryum vulgare* com as temperaturas de anelamento (Ta) mais adequadas e o número de bandas geradas.

<i>Primer</i>	Ta (°C)	Nº de bandas	<i>Primer</i>	Ta (°C)	Nº de bandas
UBC 815	45°	1	UBC 859	44°	1
UBC 835	50°	1	UBC 864	52°	1
UBC 840	45°	2	UBC 865	46°	1
UBC 841	54°	1	UBC 872	45°	1
UBC 846	49°	1	UBC 879	55°	3
UBC 847	47°	1	UBC 881	53°	2
UBC 848	48°	2	UBC 884	54°	1
UBC 852	52°	1	UBC 890	55°	2
UBC 855	45°	1	UBC 891	46°	1
UBC 856	54°	1			
Média					1,31
Total de bandas					25

Souza et al., (2009) detectaram temperaturas diferentes utilizando cinco *primers* ISSR entre eles UBC 840 e UBC 868, em genomas de babaçu, e constataram que esses dois *primers* amplificaram em temperaturas de anelamento (Ta) iguais a 55°C e 49°C, respectivamente, demonstrando que a Ta deve ser avaliada por espécie e para cada *primer*. Bornet e Branchard (2001) ressaltam que a Ta é específica e sempre superior a Tm (Temperatura de Melting) para um *primer* ISSR, pois o mesmo requer altas temperaturas para facilitar o anelamento. HRISTOVA et al., (2011) obtiveram

resultados semelhantes para os *primers* que vão de UBC 801 a UBC 805, ou seja, não tiveram amplificação devido a temperatura de fusão desses *primers* serem baixas.

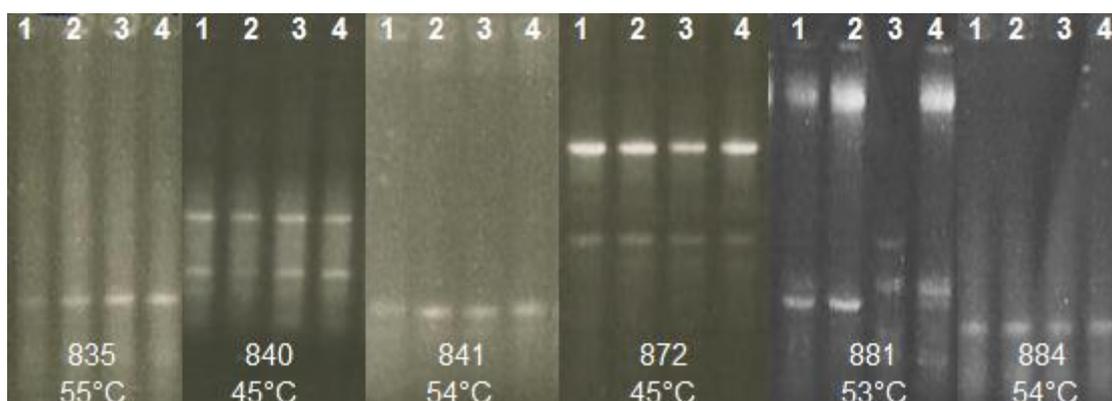


Figura 2.1. Perfís de géis de agarose contendo produtos de amplificação dos *primers* ISSR da UBC 835, 840, 841, 872, 881, 884, e suas temperaturas de anelamento ótimas, 55°C, 45°C, 54°C, 45°C, 53°C e 54°C, respectivamente, utilizando DNA de quatro genótipos de *A. vulgare* (indivíduos 1, 2, 3 e 4).

Marsafari e Mehrabi (2013) utilizaram 14 *primers* ISSR em progênies de *Phoenix dactylifera* L., dentre eles o *primer* UBC 841 com temperatura igual a 55°C que se aproximou da temperatura ótima escolhidas para *A. vulgare* de 54°C e para os iniciadores UBC 835, UBC 840 e UBC 884 encontraram temperaturas diferentes, 55°C, 53°C e 51°C, respectivamente. Esses autores demonstraram a ocorrência de 100% de polimorfismo nos *primers* UBC 840, UBC 841 e UBC 884 comparado aos demais e que tais *primers* podem ser indicados para estudos sobre diversidade genética pelos seus desempenhos. Além desses iniciadores, esses autores utilizaram outros e obtiveram boa amplificação para *P. dactylifera* sugerindo que os mesmos são adequados para *A. vulgare*.

Os marcadores ISSR também foram estudados em espécies de outros gêneros, dentre eles a espécie *Theobroma grandiflorum* descrita por Silva et al. (2011) que utilizaram 27 iniciadores, onde 15 geraram bandas nítidas e robustas, com quantidade de fragmentos e reprodutibilidade satisfatória e concluíram que os *primers* selecionados podem ser utilizados para estudos de divergência genética em populações cultivadas dessa espécie. Lima et al (2009) avaliaram a variabilidade da gravioleira (*A. muricata* L.) através dos marcadores ISSR e observaram que dos 11 *primers* testados, cinco marcadores tiveram amplificação de bandas consistentes e apresentaram um total de 47 bandas, sendo 27 delas polimórficas concluindo que marcadores do tipo ISSR podem ser utilizados na análise de divergência genética nesta espécie.

Gaiero et al (2011) estudaram a diversidade genética de espécies desse gênero utilizando cinco marcadores ISSR e relataram que esses marcadores possuem alta capacidade discriminatória entre as amostras, produzindo um total de 74 fragmentos, onde 90,5% deles demonstraram-se polimórficos e concluíram que esses marcadores podem ser utilizados em planos de conservação a longo prazo, e podem auxiliar em estudos taxonômicos de espécies estreitamente relacionadas.

Zehdi et al. (2004), aplicaram 12 iniciadores ISSR em genomas de 12 variedades de *Phoenix dactylifera* com o objetivo de identificar marcadores informativos para a investigação de estudos filogenéticos das variedades em foco. Observaram que apenas 9 amplificaram de 7 a 16 bandas polimórficas, com média de 9,11 bandas, relataram também que os padrões polimórficos gerados sugerem que o uso de marcadores do tipo ISSR, pode ser uma alternativa para examinar a diversidade genética em nível de DNA das variedades estudadas.

Souza e Lima (2013) usaram 18 iniciadores ISSR em amostras de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart) e observaram um total de 236 loci com 221 bandas polimórficas (93,64%), com média de 13 bandas por *primer*. O iniciador UBC 810 possuiu o maior número de loci ($n = 21$) enquanto o UBC 842 e o UBC 890 obtiveram menor número ($n = 9$) e concluíram que os marcadores ISSR representam uma ferramenta rápida, confiável e de baixo custo e eficaz para a identificação de genótipos e estruturação genética de populações. Ainda ressaltaram que esses marcadores podem contribuir em programas de conservação de melhoramento, considerado um recurso potencialmente valioso que ainda precisa ser aproveitada e explorada de forma eficaz.

De acordo com Rodrigues (2010) o aumento da temperatura de anelamento de *primers* ISSR para a adaptação de protocolos, pode resultar em um número menor de bandas amplificadas, o que correu nos resultados de *A. vulgare*. Por esse fato, há a necessidade de se utilizar um maior número de iniciadores para resultados mais confiáveis, mas por outro lado, a identificação de bandas homólogas é extremamente mais acurada.

Para melhores resultados, se faz necessário realizar adequações no programa de amplificação específico para cada *primer* e modificações nas reações de eletroforese para marcadores ISSR. Alguns fatores como o método de extração de DNA, quantidade de *primers* por amostra, concentração de $MgCl_2$ e concentração de dNTP devem ser estudados para obtenção de resultados satisfatórios.

2.4 CONCLUSÃO

Dos *primers* ISSR testados, 19 mostram-se capazes de amplificar produtos em genoma de *A. vulgare*, o que possibilita a utilização dos mesmos em estudos que envolvam a quantificação da variabilidade, similaridade, diversidade e divergência genética.

REFERÊNCIAS

- BORBA, R. DA S.; GARCIA, M. S.; KOVALLESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; BRANCO, J. S. C.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, n. 34, p. 565-569, 2005.
- BORNET, B.; BRANCHARD M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**; 19:209-215. 2001.
- CAETANO, M. O. In: **Revista Globo Rural**. Desafio do Biodiesel. São Paulo, n. 253, p. 40-49, Nov. 2006.
- COSTA, J. L.; OLIVEIRA, E. J.; JESUS, O. N.; OLIVEIRA, G. A. F.; NEVES, C. G. Marcadores moleculares como ferramenta para estruturação da diversidade genética em 12 genótipos de maracujazeiro. **Jornada Científica** – Embrapa Mandioca e Fruticultura. 2010.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220 p. 1998.
- GAIERO, P.; MAZZELLA, C.; AOGSTINI, G.; BERTOLAZZI, S.; ROSSATO, M. Genetic diversity among endangered Uruguayan populations of *Butia* Becc. species based on ISSR. *Plant. Syst. Evol.* 292: 105-116. 2011.
- GODWIN, I. D., AITKEN E. A. B.; Smith, L.W. Application of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. **Electrophoresis** v. 18, p. 1524–1528, 1997.
- HAMZA, H.; ABEDERRAHIM, M. A. B.; ELBEKKAY, M.; FERCHICHI, A. Comparison of the effectiveness of ISSR and SSR markers in determination of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) agronomic traits. **Australian Journal of Crop Science**.v. 7, 6 ed., p. 763-769, Maio, 2013.
- HRISTOVA, E.; STOYANOV, K.; GEVEZOVA, M.; DENEV, I. Application of ISSR methods in studying broomrape's (Orobanchaceae) biodiversity in Bulgaria. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 25, n. 1, p. 2248-2253, 2011.
- LIMA, E. N.; CAVALCANTI, J. J. V.; OLIVEIRA, F. I. C. De; CARDOSO, J. E.; BERTINI, C. H. C. De M. **Variabilidade genética de gravioleira por marcadores ISSR**. In: Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 5., Guarapari. Anais... Guarapari: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas. 2009
- LIU, B.; WENDEL, J.F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 1 p. 205-208, 2001.

MARSAFARI, M.; MEHRABI, A. A. Molecular identification and genetic diversity of Iranian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars using ISSR and RAPD markers. **Australian Journal of Crop Science** v. 7, 8 ed., p. 1160-1166, 2013.

PESCE, C. **Oleaginosas da Amazônia**. 2 ed., rev. e atual. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi; Brasília: Ministério do Desenvolvimento Agrário, 2009.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and application plant breeding. **Euphytica**, n. 128, p. 9-17, 2002.

RODRIGUES, J. F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccínea* Lindl. e *C. Mantiqueirae* (Flowie) Van der Berg (*Orchidaceae*) baseada em marcadores moleculares ISSR**. Dissertação de Mestrado, 81p. ESALQ/USP. Piracicaba, 2010.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. Belém: CIFOR, Imazon, 2005.

SILVA, B. M.; ROSSI, A. A. B.; CABRAL, J. C.; ARAUJO, V. A. A. C.; SILVA, L. H. R. **Extração de DNA e seleção de marcadores issr para análise da diversidade genética em *Theobroma grandiflorum* (WILLD. EX SPRENG.) K. SCHUM** In: Congresso de Iniciação Científica, 4ª. (JC), 2011, Cáceres/MT. Anais... Cáceres/MT: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PRPPG. Vol. 7, 2011.

SOUZA, I. G. de B.; SANTOS, M. F. Dos; GOMES, R. L. F.; VALENTE, S. E. Dos S.; SITTOLIN, I. M.; ARAÚJO, E. C. E.; LIMA, P. S. Da C. **Otimização de marcadores ISSR para análises de diversidade genética em babaçu**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 6, Montes Claros, 2009.

SOUZA, I. G. B.; SOUZA, V. A. B.; LIMA, P. S. C. Molecular characterization of *Platonia insignis* Mart. ("Bacurizeiro") using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 5, p. 3835-3845, may, 2013.

TSUMMURA, Y.; OHBA, K.; STRAUSS, S. H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*), **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, p. 40-45, 1996.

ZEHDI, S.; SAKKA, H.; RHOUMA, A.; OULD MOHAMED SALEM, A.; MARRAKCHI, M.; TRIFI, M. Analysis of Tunisian date palm germplasm using simple sequence repeat primers. **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v.3, p.215-219, 2004.

ZIETJIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**. v. 20, p. 176-183, 1994.

3 Divergência genética entre matrizes de tucumanzeiros (*Astrocaryum vulgare* Mart.) selecionadas para produção de frutos e teor de óleo na polpa por marcadores ISSR

RESUMO

O tucumanzeiro (*Astrocaryum vulgare* Mart.) destaca-se como uma das espécies nativas da Amazônia de grande potencial econômico e social à população local. Apresenta uso integral, sendo utilizado nas indústrias alimentícias, de cosméticos e de produtos medicinais. Recentemente seus frutos foram indicados como fonte de matéria prima na produção de biodiesel. Porém, há escassez de informações agronômicas sobre a espécie, resultando em grandes esforços da pesquisa, no sentido de obter pacote tecnológico para seu plantio racional, sendo o principal o fornecimento de sementes de qualidade. Por isso, a quantificação da divergência é de extrema importância, para solucionar esses problemas. Esse trabalho teve como objetivo quantificar a divergência genética entre matrizes de tucumanzeiro selecionadas para a produção de frutos e teor de óleo na polpa com base em marcadores ISSR. Para isso foi realizada a extração de DNA, após a coleta dos folíolos de 52 matrizes de *A. vulgare* sendo 29 selecionadas para produção de frutos e 29 para teor de óleo havendo seis matrizes coincidentes. As amostras foram genotipadas por 19 primers ISSR. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. As imagens obtidas foram fotodocumentadas e genotipadas. Após a contagem, foram estimadas a similaridade genética pelo coeficiente de Jaccard, a heterozigosidade e análise de variância molecular pelos programas NTSYS e GenAlex, respectivamente. Os resultados de mostraram que pelo menos dois grupos foram formados para os dois tipos de seleção através do dendrograma, a estimativa de variabilidade genética revelou que o índice de Shannon (I) tanto para fruto, quanto para óleo obtiveram valores baixos (0,253 e 0,267, respectivamente), indicando baixa diversidade genética. A análise de variância molecular demonstrou que 98% da variância se encontrou retida dentro dos grupos e apenas 2% entre eles. Os marcadores ISSR demonstraram boa amplificação nos genomas de *A. vulgare*. As matrizes selecionadas para teor de óleo apresentaram mais variabilidade que as de fruto, onde tais matrizes podem ser melhoradas via seleção recorrente intrapopulacional.

Palavras-chave: Arecaceae. Similaridade. Grupos. Variância molecular.

ABSTRACT

The fiber palm tree (*Astrocaryum vulgare* Mart.) stands out as one of the Amazonian native species of great economic and social potential for local people. It has full use and is used in food industry, cosmetics and medicinal products. Its fruits were recently listed as a source of raw material in the production of biodiesel. However, no shortage of agronomic information on the species, resulting in major research efforts, in getting technology package for its rational planting, the main supply of quality seeds. Therefore, the quantification of the difference is extremely important to solve these problems. This study aimed to quantify the genetic divergence between matrices tucumanzeiro selected for the production of fruit and oil content in the pulp based on ISSR markers. For this DNA extraction was carried out after collecting the leaflets of 52 matrices *A. vulgare* 29 being selected for fruit production and 29 for oil content having six coincident arrays. Samples were genotyped for 19 ISSR primers. The amplification products were subjected to horizontal agarose gel electrophoresis stained with 1.5% ethidium bromide. The images have been photo documented and genotyped. After counting, it was estimated by Jaccard genetic similarity coefficient, heterozygosity and analysis of molecular variance by NTSYS and GenAlex programs, respectively. The results showed that at least two groups were formed for two kinds of selection by the dendrogram, the estimated genetic variability revealed that the Shannon index (I) to both fruit, and to oil obtained low valore (0.253 and 0.267, respectively), indicating low genetic diversity. The analysis of molecular variance showed that 98% of the variance was found retained within the groups and only 2% of each other. ISSR showed good amplification in the genomes of *A. vulgare*. Matrices selected for oil content showed more variability than the fruit, where such arrays can be improved via intrapopulation recurrent selection.

Keywords: *Arecaceae*. similarity. Groups. Molecular variance.

3.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Astrocaryum* abrange 40 espécies distribuídas em 12 países, sendo constituído essencialmente por palmeiras encontradas em ecossistemas tropicais da América do Sul (CAVALCANTE, 1996). No Brasil, há a ocorrência de 26 espécies, onde algumas delas apresentam potencial econômico devido à extração de fibras, produção de frutos e de óleo (KAHN, 2008). Dentre essas espécies, encontra-se o tucumanzeiro (*A. vulgare* Mart.) que se destaca como uma das espécies nativas da Amazônia de grande potencial econômico e social à população local. Essa espécie apesar de ter uso integral, apresenta como destaque a exploração de seus frutos, os quais são utilizados na indústria de alimentos (polpa *in natura*, polpa processada, sorvete, picolé, etc.), cosméticos, medicinal, além das sementes serem utilizadas como matéria prima para artesanatos (VILLACHICA et al., 1996) e, mais recentemente, seus frutos foram indicados ao mercado de biodiesel (OTERO, 2012). Apesar do potencial apresentado, ainda é explorada pelo extrativismo, o qual não oferece produtos de qualidade. Como há escassez de informações agronômicas sobre a espécie, necessita-se de grandes esforços da pesquisa, no sentido de obter pacote tecnológico para seu plantio racional como o fornecimento de sementes de qualidade.

Uma das primeiras etapas para se domesticar uma espécie envolve a coleta de material reprodutivo em populações naturais à formação de Bancos de Germoplasma, por proporcionar a realização de estudos básicos sobre o material conservado que possam subsidiar programas de melhoramento genético (VILLELA-MORALES et al., 1997). Para esta palmeira as primeiras coletas foram realizadas durante a década de 80 à formação do primeiro Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da espécie em questão (LIMA; COSTA, 1991). Dentro desse BAG foram selecionadas matrizes com alta produção de frutos (OLIVEIRA et al., 2012) e mais recentemente, matrizes com alto teor de óleo na polpa. Contudo, para alavancar o programa de melhoramento, a quantificação da variabilidade e da divergência genética torna-se de extrema importância.

Estudos sobre divergência são úteis na identificação de progenitores que possam fornecer maior efeito heterótico e maior probabilidade na obtenção de genótipos superiores e podem ser quantificados por meio de vários marcadores dentre eles os moleculares. O uso de marcadores moleculares se tornou uma ferramenta importante pelo seu grande potencial de distinção de genótipos morfologicamente similares e

geneticamente aparentados, atualmente esses marcadores estão complementando ou substituindo a caracterização morfológica e agrônômica tradicional (TOPPA; JADOSKI, 2013). Há vários marcadores moleculares disponíveis no mercado e que podem ser úteis na quantificação da divergência genética, como os ISSR.

ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) são marcadores dominantes, baseados em microssatélites, cujos *primers* podem estar desancorados ou usualmente ancorados na extremidade 5' ou 3' por 1 a 4 bases degeneradas e possuem a vantagem de analisar locos múltiplos em uma única reação (GOULÃO; OLIVEIRA, 2001). São considerados semi-arbitrários com alta reprodutibilidade, relacionado ao tamanho do *primer* e pela necessidade de temperaturas elevadas para o anelamento, onde um único *primer* é utilizado nas reações gerando fragmentos de comprimentos variados, com abundante polimorfismo (LIU; WENDEL, 2001; TSUMURA *et al.*, 1996; REDY *et al.*, 2002). Podem ser recomendados em análises de espécies relacionadas evolutivamente, com resultados confiáveis, sendo marcadores de alta reprodutibilidade, locos polimórficos em quantidades satisfatórias e por apresentarem rapidez em seus resultados com custos razoavelmente menores em comparação aos outros marcadores (RODRIGUES, 2010). Por serem robustos e mais eficientes que os marcadores RAPD o uso desses marcadores torna-se de grande importância para se caracterizar o *A. vulgare*, pois através deles é possível realizar cruzamentos e aumentar a eficiência da seleção nas etapas do programa de melhoramento genético da espécie (CLEMENT, 2001).

Ressalta-se também a quase inexistência de estudo sobre a quantificação da variabilidade e da divergência genética com base em marcadores moleculares abordando a espécie em questão. O único trabalho encontrado utilizou marcadores RAPD na quantificação da divergência genética de matrizes selecionadas para produção de frutos (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Assim, objetivou-se quantificar a divergência genética entre matrizes de tucumazeiro selecionadas para a produção de frutos e teor de óleo na polpa com base em marcadores ISSR.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O material genético utilizado no presente trabalho se refere a dois grupos de matrizes de tucumazeiro conservados no Banco de Germoplasma (BAG-tucumã) da Embrapa Amazônia Oriental Belém-PA. O primeiro grupo representa 29 matrizes

selecionadas para produção de frutos e o segundo grupo por 29 matrizes selecionadas para alto teor de óleo na polpa, totalizando 52 matrizes, pois seis delas são comuns aos dois grupos (Tabela 3.1). Dessas matrizes foram retirados folíolos para a extração de DNA genômico total.

Tabela 3.1. Identificação das 52 matrizes de tucumã do Pará sendo 29 selecionadas para produção de fruto e 29 para teor de óleo.

Nº LABGEN	Nº Campo	Seleção	Procedência	Nº LABGEN	Nº Campo	Seleção	Procedência
1	Tuc 1-1	O	Marapanim-PA	27	Tuc 12-4	O	Salinópolis-PA
2	Tuc 1-3	F e O	Marapanim-PA	28	Tuc 13-3	O	Salinópolis-PA
3	Tuc 2-2	F	Marudá-PA	29	Tuc 14-1	O	Salinópolis-PA
4	Tuc 2-3	F e O	Marudá-PA	30	Tuc 15-1	F	Salinópolis-PA
5	Tuc 2-4	F e O	Marudá-PA	31	Tuc 15-3	F	Salinópolis-PA
6	Tuc 2-6	F	Marudá-PA	32	Tuc 16-1	F	Salinópolis-PA
7	Tuc 3-1	F	Marapanim-PA	33	Tuc 16-2	F	Salinópolis-PA
8	Tuc 3-3	F	Marapanim-PA	34	Tuc 16-3	F e O	Salinópolis-PA
9	Tuc 4-1	F	Curuçá-PA	35	Tuc 16-4	O	Salinópolis-PA
10	Tuc 4-3	F	Curuçá-PA	36	Tuc 16-5	O	Salinópolis-PA
11	Tuc 4-4	F	Curuçá-PA	37	Tuc 19-3	O	Bragança-PA
12	Tuc 4-5	O	Curuçá-PA	38	Tuc 19-4	O	Bragança-PA
13	Tuc 4-6	F e O	Curuçá-PA	39	Tuc 20-2	F	Bragança-PA
14	Tuc 4-7	O	Curuçá-PA	40	Tuc 20-3	F	Bragança-PA
15	Tuc 4-8	F	Curuçá-PA	41	Tuc 20-4	O	Bragança-PA
16	Tuc 4-9	F	Curuçá-PA	42	Tuc 20-6	O	Bragança-PA
17	Tuc 5-4	O	Magalhães Barata-PA	43	Tuc 20-7	F e O	Bragança-PA
18	Tuc 6-1	F	Maracanã-PA	44	Tuc 21-1	F	Bragança-PA
19	Tuc 6-5	F	Maracanã-PA	45	Tuc 21-4	F	Bragança-PA
20	Tuc 6-6	F	Maracanã-PA	46	Tuc 28-1	O	Carutapera-MA
21	Tuc 6-9	F	Maracanã-PA	47	Tuc 28-3	O	Carutapera-MA
22	Tuc 8-5	O	Primavera-PA	48	Tuc 28-4	O	Carutapera-MA
23	Tuc 9-2	F	Salinópolis-PA	49	Tuc 28-5	O	Carutapera-MA
24	Tuc 9-6	F	Salinópolis-PA	50	Tuc 30-5	O	Pinheiro-MA
25	Tuc 10-4	O	Igarapé-Açu-PA	51	Tuc 31-2	O	Pinheiro-MA
26	Tuc 12-3	O	Salinópolis-PA	52	Tuc 31-8	O	Pinheiro-MA

F: fruto; O: óleo.

A extração de DNA seguiu o protocolo CTAB proposto por Doyle & Doyle (1987) com algumas modificações (COSTA; OLIVEIRA, 2002). Após a extração do

DNA foi procedida a quantificação das 52 amostras em gel de agarose a 1%, coradas com o corante brometo de etídio e comparadas com DNA padrão do fago lambda em três concentrações distintas (50, 100 e 200 ng/ul⁻¹), sendo auxiliada pelo programa Labimage. Em seguida, as amostras foram diluídas para a concentração de trabalho de 10 ng/ul e armazenadas em ultrafreezer, até o momento do uso nas análises de PCR com marcadores ISSR.

Foram selecionados previamente 19 primers ISSR e aplicados nos dois grupos de matrizes de *A. vulgare* (Tabela 3.2). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador AB (Applied Biosystems) para um volume final de 20 µL por amostra e contendo: 8,18 µL de água miliq (ultra pura), 2,2 µL de Tampão (10x PCR-MgCl₂), 2 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,38 µL de dNTPs (100 µl de cada dNTP e 600 µl H₂O mili-Q), 1,38 µL de BSA (2,5 mg/ml), 2,66 µL de *primer*, 0,2 µL de TAQ polimerase (5 U/µl) e 2 µL de DNA (10 ng). O programa de amplificação utilizado foi o de acordo com Souza et al (2009), que possui uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 1,5 min, seguida de 40 ciclos nas seguintes condições: 40s para desnaturação a 94°C; temperatura de anelamento igual a 47°C; 2 min para extensão a 72°C. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 min.

Tabela 3.2. Identificação dos 19 *Primers* ISSR selecionados para *Astrocaryum vulgare* e suas temperaturas de anelamento.

Primer	Sequência	Ta (°C)	Primer	Sequência	Ta (°C)
UBC 815	(CT) ₈ G	45°	UBC 859	(TG) ₈ RC	44°
UBC 835	(AG) ₈ YC	50°	UBC 864	(ATG) ₆	52°
UBC 840	(GA) ₈ YT	45°	UBC 865	(CCG) ₆	46°
UBC 841	(GA) ₈ YC	54°	UBC 872	(GATA) ₄	45°
UBC 846	(CA) ₈ RT	49°	UBC 879	(CTTCA) ₃	55°
UBC 847	(CA) ₈ RC	47°	UBC 881	(AT) ₈ YA	53°
UBC 848	(CA) ₈ RG	48°	UBC 884	HBH(AG) ₇	54°
UBC 852	(TC) ₈ RA	52°	UBC 890	VHV(GT) ₇	55°
UBC 855	(AC) ₈ YT	45°	UBC 891	HVH(TG) ₇	46°
UBC 856	(AC) ₈ YA	54°			

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% corados por brometo de etídio com tampão TBE 1X e Ladder de 1kb

(Invitrogen), conduzida em 90 V por 1,5 h. Os resultados das eletroforeses foram visualizados em transluminador sob luz ultravioleta, digitalizados e armazenados para posterior avaliação.

A avaliação foi realizada por meio da presença (1) e ausência (0) de bandas, para elaboração da matriz binária para estimar a similaridade entre as amostras com base no coeficiente de Jaccard. As análises de divergência foram realizadas no programa NTSYS-pc na versão 2.02, para a aquisição das dissimilaridades genéticas organizadas por dendrograma que foi obtido pelo método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA) (*Unweighted pair-group method averages*) (SNEATH; SOKAL, 1973).

A matriz binária, foi empregada para o cálculo das similaridades genéticas através do coeficiente de Jaccard pela expressão:

$$sg_{ij} = \frac{a}{(a + b + c)}$$

Onde:

sg_{ij} : coeficiente de Jaccard

a : número da ocorrência da presença das bandas no par de genótipos i e j ;

b : número da ocorrência da presença da banda somente em i ;

c : número da ocorrência da presença da banda somente em j ;

O método de Tocher foi obtido através da matriz de similaridade gerada pela formação do grupo de início baseado no par de indivíduos mais próximos. Para método foi estabelecido um critério, onde a distância média intragrupos foi mantida sempre inferior a qualquer distância intergrupos (RAO, 1952), para a inclusão de novos indivíduos através de:

Se $\frac{d_{(\text{grupo})}^k}{n} \leq \theta$, o indivíduo k é inserido no grupo;

n

Se $\frac{d_{(\text{grupo})}^k}{n} > \theta$, o indivíduo k não será inserido no grupo.

n

Em que:

n : número de indivíduos que fazem parte do grupo de início.

O valor médio dentro de um grupo sofre um aumento quando se insere um genótipo dentro do mesmo. Dessa forma, essa inserção pode ser realizada através da comparação entre o acréscimo no valor médio da distância dentro do grupo e um nível máximo permitido, podendo ser de forma arbitrária, ou adotada, realizado mais comumente, o valor máximo da medida de similaridade encontrado no conjunto das menores distâncias envolvendo cada um dos indivíduos (CRUZ et al., 2004). Para a estimativa da variância (AMOVA) através da matriz de distância genética de Nei, o programa GenAlex 6 (PEAKALL; SMOUSE, 2006) foi utilizado, para avaliar a distribuição da variação genética entre as matrizes.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos dezenove iniciadores, três não amplificaram bandas nítidas e dezesseis geraram 87 bandas no grupo das 29 matrizes selecionadas para produção de fruto. Desse total, 49 mostraram-se polimórficas com média de 5,4% de bandas por iniciador. O número de marcadores polimórficos variou de zero (UBC 840, UBC 859, UBC 864 e UBC 891) a seis (UBC 815 e UBC 846) e encontram-se descritas na Tabela 3.4. O *primer* UBC 846 apresentou a maior percentagem de polimorfismo com 85,7% seguido do UBC 815 com 75%, indicando que os mesmos podem ser utilizados para acessar o genoma da espécie em foco com sucesso. Hamza et al. (2013) utilizando os *primers* UBC 890 e UBC 891 em *Phoenix dactilyfera* relataram padrão de amplificação similar e consideraram como adequado com bandas claras e consistentes e ainda detectaram menor número de bandas polimórficas (34). Já Marsafari e Mehrabi (2013) obtiveram 162 bandas com 95,67% de polimorfismo ao aplicarem 14 *primers* ISSR em genomas também de *P. dactilyfera* e consideraram marcadores robustos na divergência e diversidade genética. A Figura 3.1 apresenta o padrão de amplificação do *primer* UBC835 mostrando um grande número de bandas.

O dendrograma separou as 29 matrizes selecionadas para produção de frutos a partir de 70% de similaridade, a maior similaridade foi registrada entre as matrizes Tuc-10 e Tuc-11 com 95,2% e, a menor, entre as matrizes Tuc-3 e Tuc-45 com 62,3%. Oliveira et al (2012) ao aplicarem 24 *primers* RAPD nessas mesmas matrizes, observaram que o valor médio de similaridade foi de 51,7%, onde esse resultado demonstra considerável variabilidade genética no grupo.

Tabela 3.3. Total de bandas, de bandas polimórficas e porcentagem de polimorfismo gerado pelos 16 *primers* ISSR aplicados no grupo de matrizes de tucumazeiro selecionadas para produção de frutos.

<i>Primer</i>	Total de bandas	Bandas polimórficas	Polimorfismo (%)
UBC 815	8	6	75,0
UBC 835	7	5	71,4
UBC 840	1	0	0,0
UBC 841	5	4	80,0
UBC 846	7	6	85,7
UBC 847	5	4	80,0
UBC 848	4	2	50,0
UBC 852	9	5	55,5
UBC 855	6	4	66,7
UBC 856	10	5	50,0
UBC 859	1	0	0,0
UBC 864	2	0	0,0
UBC 872	7	2	28,5
UBC 879	7	3	42,8
UBC 890	5	3	60,0
UBC 891	3	0	0,0
Média	5,4	3,1	46,6
Total	87	49	-



Figura 3.1. Perfil de amplificação em gel de agarose 1,5% do *primer* UBC 835 nas 29 matrizes de tucumazeiro selecionadas para a produção de frutos.

Com base no dendrograma percebe-se a formação de dois grandes grupos com vários subgrupos (Figura 3.2). O primeiro grupo formado por 10 matrizes, com destaque para a matriz Tuc-45 que ficou isolada das demais, e o segundo grupo por 19 matrizes, composto de dois subgrupos, um contendo cinco e o outro 14 matrizes. A correlação cofenética foi alta ($r= 0,82$), evidenciando alta confiabilidade na formação desses agrupamentos. De um modo geral, percebe-se que houve tendência na formação dos agrupamentos por matrizes da mesma procedência (localidade) ou de municípios

próximos, inclusive com separação de subgrupos por localidade (Tabela 3.1 e Figura 3.2). Por exemplo, no grupo I as matrizes são oriundas de Salinópolis (Tuc-30, Tuc-32, Tuc-31, Tuc-33 e Tuc-34) e Bragança (Tuc-39, Tuc-40, Tuc-43, Tuc-44 e Tuc-45).

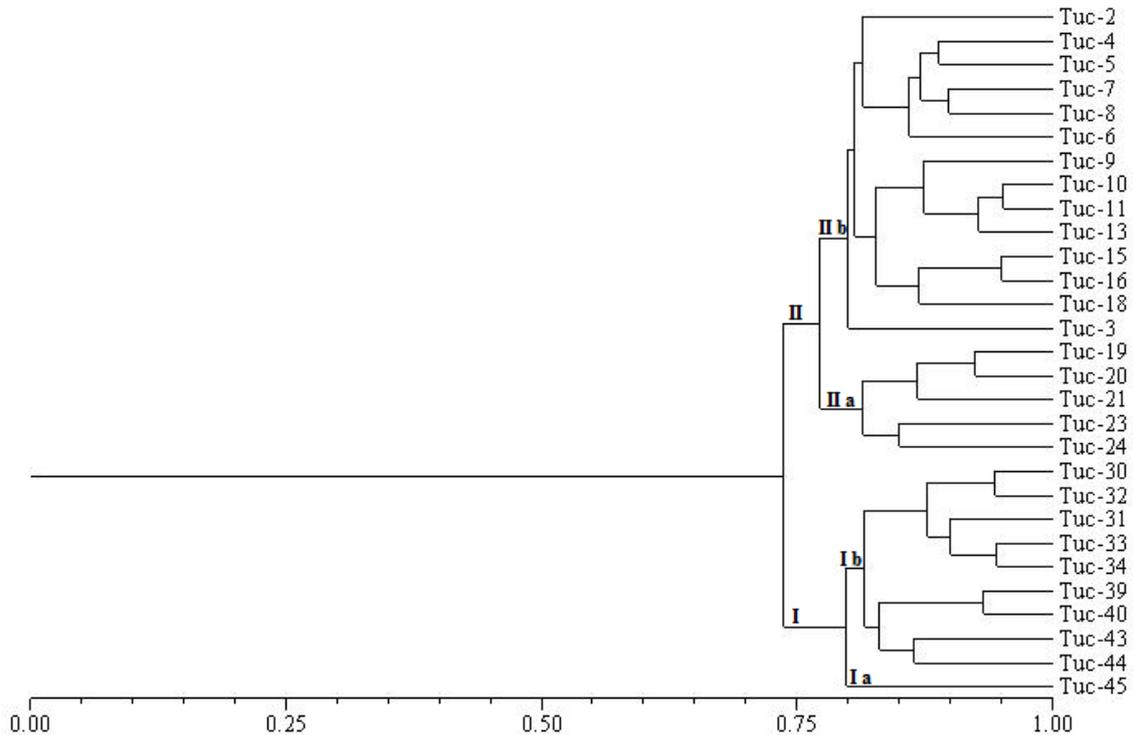


Figura 3.2. Dendrograma gerado a partir das similaridades genéticas obtidas pelo coeficiente de Jaccard entre os genomas das 29 matrizes de tucumã-do-pará selecionadas para produção de frutos, com base nas 87 bandas obtidas por 16 *primers* ISSR.

No grupo de matrizes selecionadas para teor de óleo na polpa foram encontradas também 87 bandas, com média de 5,4 bandas por *primer*, dentre elas 51 mostraram-se polimórficas, sendo esse grupo de matrizes mais polimórfico do que o de produção de frutos (Tabela 3.5). O número de bandas polimórficas por *primer* variou de 0 (UBC 859, UBC 864 e UBC 891) a 6 (UBC 815, UBC 846). O *primer* UBC 840 obteve a maior percentagem de polimorfismo (100%), seguido do *primer* UBC 846 com 85,7%.

Tais resultados sugerem que o baixo número de bandas e polimorfismo encontrado, seja decorrente das proximidades geográficas onde as matrizes foram coletadas e pelo alto grau de parentesco materno existente entre as mesmas.

Tabela 3.4. Total de bandas, de bandas polimórficas e da porcentagem de polimorfismo gerado pelos 16 *primers* ISSR no grupo das 29 matrizes de tucumazeiro selecionadas para teor de óleo na polpa.

<i>Primer</i>	Total de bandas	Bandas polimórficas	Polimorfismo (%)
UBC 815	8	6	75,0
UBC 835	7	5	71,4
UBC 840	1	1	100,0
UBC 841	5	4	80,0
UBC 846	7	6	85,7
UBC 847	5	4	80,0
UBC 848	4	2	50,0
UBC 852	9	5	55,6
UBC 855	6	5	83,3
UBC 856	10	5	50,0
UBC 859	1	0	0,0
UBC 864	2	0	0,0
UBC 872	7	2	28,6
UBC 879	7	3	42,9
UBC 890	5	3	60,0
UBC 891	3	0	0,0
Média	5,4	3,2	53,9
Total	87	51	-

O dendrograma gerado para o grupo de matrizes selecionadas para teor de óleo na polpa formou também dois grandes grupos com, pelo menos, dois subgrupos no segundo grupo (II a e II b) a partir de 70% de similaridade genética. A maior similaridade foi encontrada entre o par Tuc-27 e Tuc-29 com mais de 95% de similaridade entre os genomas (Figura 3.3). Nesse caso, também houve tendência da formação de grupos por localidade, sendo, porém menor do que no grupo de matrizes selecionadas para produção de frutos. Podendo-se destacar o grupo I formado por genomas de três matrizes (Tuc-50, Tuc-51 e Tuc-52) oriundas de Pinheiro, MA.

Silva (2013) ao aplicar cinco *primers* ISSR em genomas de macaúba (*Acrocomia aculeata*), dentre eles o *primer* UBC 835 obteve média de bandas polimórficas por *primer* bem menor que a encontrada no presente estudo(2,2) e relacionou ao pequeno número de *primers* utilizado.

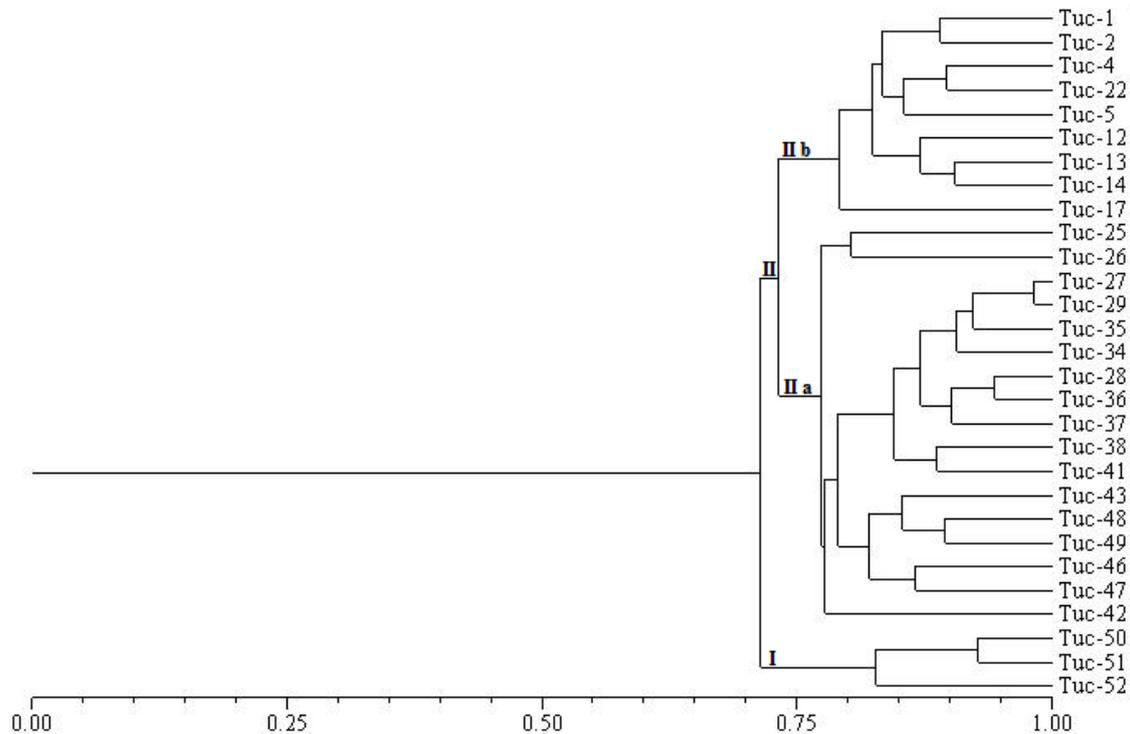


Figura 3.3. Dendrograma gerado a partir das similaridades genéticas obtidas pelo coeficiente de Jaccard entre os genomas das 29 matrizes de tucumã-do-pará, selecionadas para teor de óleo na polpa, com base nas 87 bandas obtidas por 16 primers ISSR.

De acordo com Sabir et al. (2014), marcadores ISSR são baseados em regiões repetidas em séries de curtas sequências de DNA consideradas altamente polimórficas mesmo entre genótipos estreitamente relacionados, devido à falta de limitações funcionais em regiões não codificantes do DNA. Esses autores ao utilizarem 13 *primers* ISSR em genomas de tâmara (*P. dactylifera*) constataram alto grau de polimorfismo (114 bandas com 85% de polimorfismo e 8,8 bandas/primer) bem acima do detectado nos genomas dos dois grupos de matrizes de *A. vulgare* aqui estudados.

Por outro lado Srivashtav et al (2013) ao aplicarem 18 *primers* ISSR em genomas, também, de tâmara verificaram que, apenas dois deles se mostraram polimórficos e geraram 13 bandas, sendo três polimórficas, ou seja, baixo nível de polimorfismo (23,07%).

Primers ISSR também se mostraram mais polimórficos do que qualquer outro tipo de marcador, em estudos para distinção de indivíduos em germoplasma estreitamente relacionados (GUPTA et al, 1994;. SALIMATH et al., 1995; VIRK et al., 2000).

As inferências feitas com base nos marcadores ISSR para os dois grupos de matrizes de tucumanzeiro quanto ao número de alelos observados (N_a) e o número

efetivo de alelos (N_e) evidenciam que os dois grupos foram semelhantes e mostraram baixos valores (Tabela 3.6). No caso do índice de Shannon (I) os valores foram de 0,253 (frutos) e de 0,267 (óleo), indicando baixa diversidade genética nos dois grupos. Este índice é indicado em análises com marcadores dominantes, pois não se baseia na heteroziguidade, o que se torna vantajoso, pois a maioria dos índices de diversidade é dependente da estimativa da heteroziguidade (ESTOPA et al., 2006). Os valores encontrados de “ I ” nos dois grupos indicam alto grau de certeza de que os grupos sejam próximos geneticamente, o que explica a concordância de seis genomas nos dois grupos. Chagas et al. (2015), encontraram valores próximos a estes para o dendê (*Elaeis guineensis*), quando utilizaram seis locos ISSR, com valores de 0,194 e 0,285 para a diversidade genética de Nei e o índice de Shannon, respectivamente.

Tabela 3.5. Estimativa de variabilidade genética nos dois grupos de matrizes selecionadas de *A. vulgare* por marcadores ISSR.

População	Na	Ne	I	H	P%
Fruto	1,517 (0,059)	1,281 (0,038)	0,253 (0,030)	0,167 (0,021)	54,02%
Óleo	1,540 (0,059)	1,288 (0,037)	0,267 (0,029)	0,174 (0,020)	56,32%

Na: número de alelos observados; Ne: número efetivo de alelos; I: índice de Shannon; h: diversidade genética de Nei; P%: porcentagem de locos polimórficos; (): desvio padrão.

Em comparação com a diversidade genética de Nei obtida em três populações de buriti (*Mauritia flexuosa*), os valores encontrados nos dois grupos de matrizes de tucumanzeiro foram considerados baixos (ROSSI et al., 2014).

A análise de variância molecular realizada entre e dentro dos dois grupos de matrizes de tucumanzeiro com o uso dos 87 marcadores ISSR expressa que 98% da variação detectada se encontra dentro dos grupos e apenas 2% entre os grupos (Tabela 3.7). Esse resultado permite inferir que trabalhando com esses dois grupos de matrizes como população base o melhoramento genético do tucumanzeiro deve seguir a seleção intrapopulacional com maior sucesso.

Para Hamrick (1989), espécies com grandes populações, com sistema misto de reprodução e mecanismos eficientes de dispersão de pólen e sementes apresentam, em geral, alta variabilidade genética dentro das populações e baixa entre elas. Esse autor ressalta também que espécies que apresentam intenso movimento de pólen e sementes têm menor diferenciação entre populações do que espécies com fluxo gênico restrito. Os

resultados descritos no presente estudo estão de acordo com vários trabalhos realizados com espécies tropicais que atestam maior diferenciação dentro de populações (OLIVEIRA; SILVA, 2008; ROSSI, 2014).

Tabela 3.6. Análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro de dois grupos de matrizes de tucumazeiro (*A. vulgare*) com base em 87 marcadores ISSR.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Componente de variação	Porcentagem%
Entre grupos	1	12,621	12,621	0,161	2%
Dentro de grupos	56	445,621	7,958	7,958	98%
Total	57	458,241	20, 579	8,118	100%

De um modo geral, esses resultados são de suma importância, pois os marcadores ISSR foram capazes de identificar quais os genótipos mais divergentes dentro e entre grupos, e esses resultados podem orientar na escolha dos parentais para cruzamento em programas de melhoramento.

3.4 CONCLUSÃO

Os marcadores ISSR demonstram boa amplificação, nos genomas das matrizes de tucumazeiro selecionadas para a produção de frutos e teor de óleo. Pelo menos, três grupos divergentes podem ser indicados para compor programas de melhoramento.

As matrizes selecionadas para teor de óleo demonstram conter maior variabilidade genética do que as de fruto e as seis matrizes coincidentes nesses dois grupos selecionados expressam considerável divergência. Tais matrizes podem ser melhoradas via seleção recorrente intrapopulacional.

REFERÊNCIAS

CHAGAS, K. P. T.; SOUSA, R. F.; FAJARDO, C. G.; VIEIRA, F. A. Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineensis*. **Rev. Bras. Ciênc. Agrár.** Recife, v.10, n.1, p.147-152, 2015.

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

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 6ed. Belém: CNPq/ Museu Paraense Emílio Goeldi, 279p. 1996.

COSTA, M. R.; OLIVEIRA, M. do S. P. Extração de DNA de açazeiro a partir de folhas. **Embrapa Amazônia Oriental, Documentos**. n.127. 2002.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Vol. 1, Viçosa: UFV, cap. 5, p. 171, 201, 2004.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.19, p.11-15, 1987.

ESTOPA, R. A.; SOUZA, M. S.; MOURA, M. C. O.; BOTREL, M. C. G; MENDONÇA, E. G.; CARVALHO, D. Diversidade genética em população natural de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish). **Scientia Florestalis**. n. 70, p. 97-106, 2006.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, n. 122, p. 81-89, 2001.

GUPTA, M., Y-S.; CHYI, J. ROMERO-SEVERSON; J. L. OWEN. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor Appl Genet* 89: 998–1006. 1994

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. **The genetic structure of tropical tree populations: associations with reproductive biology**. In: BOCK, J. H.; LINHART, Y. B. (Ed.). *The evolutionary ecology of plants*. Boulder: Westview Press, 1989. p. 129-146.

HAMZA, H.; ABEDERRAHIM, M. A. B.; ELBEKKAY, M.; FERCHICHI, A. Comparison of the effectiveness of ISSR and SSR markers in determination of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) agronomic traits. **Australian Journal of Crop Science**. v. 7, 6 ed., p. 763-769, Maio 2013.

KAHN, F. The genus *Astrocaryum*. Las palmeras en América del Sur – **Revista Peruana de Biología**, v. 15, n.1, p. 031-048, 2008.

LIMA, R. R.; COSTA, J. P. C da. **Registro de introduções de plantas de cultura pré-colombiana coletadas na Amazônia Brasileira**. Belém: EMBRAPA-CPATU, 191 p. (Documentos, 58). 1991.

LIU, B.; WENDEL, J. F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, v.1, p.205-208, 2001.

MARSAFARI, M.; MEHRABI, A. A. Molecular identification and genetic diversity of Iranian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars using ISSR and RAPD markers. **Australian Journal of Crop Science** v. 7, 8 ed., p. 1160-1166, 2013.

OLIVEIRA, N. P. de; OLIVEIRA, M. do S. P. de; MOURA, E. F. Variabilidade e divergência genética entre genótipos de tucumazeiro-do-pará (*Astrocaryum vulgare* mart.) promissores para a produção de frutos por marcadores RAPD. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 34, n. 1, p. 216-226, Março 2012.

OTERO, L. E. S. Limites e potencialidades de tucumã como fonte de energia para regiões isoladas da Amazônia. Dissertação de Mestrado em Ciências Mecânicas, Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 79p. 2012.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENEALX 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. **Mol. Ecol. Notes**, 6:288–29, 2006.

RAO, R. C. **Advanced statistical methods in biometric research**. New York. John Willey and Sons, 390p., 1952.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and application plant breeding. **Euphytica**, n. 128, p. 9-17, 2002.

RODRIGUES, J. F. Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya occínea* Lindl. e *C. Mantiqueirae* (Flowie) Van der Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR. Dissertação de Mestrado, 81p. ESALQ/USP. Piracicaba, 2010.

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. *Sci. For.*, Piracicaba, v. 42, n. 104, p. 631-639, dez. 2014.

SABIR, J. S. M.; ABO-ABA, S.; BAFEEL, S.; ZARI, T. A.; EDRIS, S.; SHOKRY, A. M.; ATEF, A.; GADALLA, N. O.; RAMADAN, A. M.; AL-KORDY, M. A.; EL-DOMYATI, F. M.; JANSEN, R. K.; BAHIELDIN, A. Characterization of tem date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars from Saudi Arabia using AFLP and ISSR markers. **Molecular biology and genetics**, Ed. Elsevier, p 6-18. 2014

SALIMATH, S. S., A. C. de OLIVEIRA, I. D. GODWIN, J. L. BENNETZEN. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. *Genome* 38: 757–763. 1995.

SILVA, L. C. C. **Estrutura genética e filogeografia molecular de populações naturais de *Acrocomia aculeata* nos estados de Minas Gerais e São Paulo.** 40 f Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2013.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy:** The principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573p.

SOUZA, I. G. de B.; SANTOS, M. F. dos; GOMES, R. L. F.; VALENTE, S. E. dos S.; SITTOLIN, I. M.; ARAÚJO, E. C. E.; LIMA, P. S. da C. **Otimização de marcadores ISSR para análises de diversidade genética em babaçu.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 6, Montes Claros, 2009.

SRIVASHTAV, V. S.; KAPADIA, C. V.; MAHATMA, M. K.; JHA, S.K.; JHA, S.; AHMED, T. Genetic diversity analysis of date palm (*Phoenix dactylifera*L.) in the Kutch region of India using RAPD and ISSR markers. Emir. J. Food Agric., 25: 907-915. 2013.

TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis** – SAP Mal. Cdo. Rondon, v 12, n 1, jan-mar, p.1-5, 2013.

TSUMURA, Y.; OHBA, K.; STRAUSS, S. H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, n. 1, p. 40-45, 1996.

VILELA-MORALES, E. A.; VALOIS, A. C. C.; NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetales.** Brasília: CENARGEN, 78p. 1997.

VILLACHICA, H.; CARVALHO, J. E. U.; MÜLLER, C. H.; DÍAZ, S. C.; ALMANZA, M. **Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia.** p. 264-267. Tratado de Cooperación Amazonica, (TCA-SPT, 44). Lima: FAO. 1996.

VIRK, P.S., J. ZHU, H.J. NEWBURY, G.J. BRYAN, M.T. JACKSON & B.V. FORD-LLOYD. Effectiveness of different classes of molecular marker for classifying and revealing variation in rice (*Oryza sativa*) germplasm. **Euphytica** 112: 275–284. 2000

4 Divergência genética entre matrizes de tucumanzeiros (*Astrocaryum vulgare* Mart.) selecionadas para produção de frutos e teor de óleo na polpa por marcadores SSR

RESUMO

O tucumã-do-Pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.) é uma das várias espécies comumente encontradas na bacia amazônica, vegetando em terrenos secos. Essa palmeira é muito utilizada como remédio caseiro, na alimentação humana e de animais, construções de abrigos, extração de fibras, produção artesanal, além da caça e da pesca. Possui grande potencial para a produção de óleo, com excelente fonte de vitamina A, mas poucos estudos são relatados no sentido de contribuir para a sua domesticação. O objetivo desse trabalho foi verificar a divergência genética entre matrizes de tucumanzeiros selecionadas para a produção de frutos e teor de óleo na polpa por meio de marcadores SSR. Para tanto foram utilizados dois grupos de matrizes de tucumanzeiros conservados em Banco de Germoplasma (BAG-tucumã), o primeiro grupo selecionado para produção de frutos e o segundo para teor de óleo na polpa, ambos com 29 matrizes, onde seis delas se repetem nos dois grupos. Após a extração de DNA as amostras foram quantificadas em gel de agarose a 1% pela comparação com DNA do fago lambda nas concentrações de 50, 100 e 200 ng/ul⁻¹. Para as PCR's foram testados vinte locos SSR, sendo oito desenvolvidos para *Bactris gasipaes* (pupunheira) e doze para *Astrocaryum aculeatum* (Tucumã-do-Amazonas). A eletroforese vertical foi realizada em gel de poliacrilamida a 7%, corado com nitrato de prata a 0,04% e os géis escaneados para a contagem dos alelos. Os dados obtidos foram analisados nos programas NTSYS e GenAlex. Os resultados demonstram que o dendrograma formou pelo menos dois grupos tanto para a seleção de óleo, quanto para a seleção de fruto. A estimativa de variabilidade demonstrou que a heterozigiosidade observada (H_o : 0,368 para fruto e óleo) foi menor que a esperada (fruto: 0,492, óleo: 0,473), a análise de variância molecular revelou que maior percentagem da variância está dentro dos grupos (73,22%) e a taxa de fluxo gênico se mostrou alta (3,382), indicando grande movimentação de genes entre as matrizes.

Palavras-chave: Marcadores moleculares. Microssatélites. Heterozigiosidades. Tucumã-do-pará. Variabilidade.

ABSTRACT

The fiber palm tree (*Astrocaryum vulgare* Mart.) is one of several species commonly found in the Amazon basin, vegetate on dry land. This palm is widely used as a home remedy, in food and animals, buildings shelters, fiber extraction, craft production, as well as hunting and fishing. It has great potential for the production of oil, with excellent source of vitamin A, but few studies are reported to contribute to its domestication. The aim of this study was to evaluate the genetic divergence between matrices of fiber palm tree selected for the production of fruit and oil content in the pulp through SSR markers. Therefore, we used two groups of fiber palm tree arrays maintained in Germplasm Bank (BAG-tucumã), the first group selected for fruit production and the second for oil content in the pulp, both with 29 matrices, where six of them are repeated in two groups. After DNA extraction, the samples were quantified agarose gel 1% by comparison with lambda DNA at concentrations of 50, 100 and 200 ng / ul-1. For the PCR's were tested twenty SSR loci, eight developed for *Bactris gasipaes* (peach palm) and twelve to *Astrocaryum aculeatum* (Tucumán-the-Amazon). The vertical eletrofore was done polyacrylamide gel and 7%, stained with silver nitrate to 0.04% gels and scanned to count the alleles. The data were analyzed in NTSYS and GenAlex programs. The results demonstrate that the dendrogram formed at least two groups both for the selection of oil, and for the selection of fruit. The estimation of variability demonstrated that the observed heterozygosity (H_o : 0.368 to fruit and oil) was lower than that observed (result: 0.492 oil: 0.473), the analysis of molecular variance revealed that higher percentage of variance is within the groups (73 , 22%) and flow rate gene showed high (3.382), indicating a large movement of genes between the dies.

Keywords: Molecular markers, Microsatellites. Heterozygosity. Tucumã palm. Variability.

4.1 INTRODUÇÃO

O tucumã-do-Pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.) é uma das várias espécies comumente encontradas na bacia amazônica, geralmente localizada em terrenos secos. Esta palmeira apresenta estipe com 8 a 10 m de altura, os frutos são da cor amarelo-avermelhada e de formato ovoide e a polpa, que reveste o caroço externamente, é comestível, oleosa, de paladar doce que é muito utilizada na indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia (PESCE, 2009).

Sua utilização está relacionada principalmente aos costumes das populações onde esta espécie é encontrada, muito usada como remédio caseiro, na alimentação humana e de animais, construções de abrigos, extração de fibras, produção artesanal, além da caça e da pesca. Possui grande potencial para a produção de óleo, semelhante ao dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.), com excelente fonte de vitamina A. Contudo, apesar de ser vista como uma das palmeiras mais importantes para a região amazônica, seu uso ainda se restringe ao autoconsumo das comunidades rurais e urbanas, onde poucos estudos são relatados no sentido de contribuir para a sua domesticação (LIMA et al., 1986).

Assim, para conhecer melhor e contribuir com sua domesticação o uso de marcadores moleculares torna-se essencial na obtenção de tais informações, otimizando o uso na diversidade genética, auxiliando no estabelecimento de prioridades para programas de melhoramento (BATUGAL et al., 2005; RIBEIRO et al., 2010). A investigação da variabilidade genética entre grupos de indivíduos selecionados de *A. vulgare* é de extrema importância para desenvolver cultivares superiores, principalmente na seleção de parentais divergentes para potencializar a heterose através de hibridações realizadas na espécie em questão (DAHER et al., 2002).

Muitos marcadores moleculares são utilizados para estudos que demonstrem a divergência genética entre indivíduos ou populações, dentre eles tem-se o SSR (*Simple Sequence Repeats*) que são os mais indicados para estudos de estrutura genética de populações, pois apresentam alta taxa de mutação gerada pelas suas regiões, por serem multialélicos e pela ampla distribuição no genoma, são capazes de identificar alto grau de polimorfismo (ZUCCHI, 2002; MEDEIROS et al., 2006). São comumente chamados de microssatélites, possuem como característica a codominância, sendo constituídos por pequenas sequências que variam de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em *tandem* (LITT; LUTY, 1989; WEBER; MAY, 1989; TAUTZ, 1989).

Marcadores microssatélites apresentam ampla distribuição no genoma de procariotos e eucariotos, com maior frequência em regiões não codificantes, com alta taxa de mutação quando comparados com regiões codificantes (TAUTZ, 1989; ZANE *et al.*, 2002; SELKOE; TOONEN, 2006). Possuem alto grau de heterozigosidade e conteúdo informativo em meio aos marcadores moleculares, permitindo a diferenciação entre indivíduos de forma eficiente (FERREIRA; GRATAPLAGIA, 1998; BUSO *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Na literatura disponível há relatos de seus usos em estudos sobre a divergência genética em vários trabalhos com palmeiras (OLIVEIRA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2009; SANTANA *et al.*, 2011).

Deste modo, objetivou-se verificar a divergência genética entre matrizes de tucumanzeiros selecionadas para a produção de frutos e teor de óleo na polpa por meio de marcadores SSR.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no laboratório de genética e biologia molecular da Embrapa Amazônia Oriental. Foram retirados folíolos de dois grupos de matrizes de tucumanzeiros conservados em Banco de Germoplasma (BAG-tucumã): primeiro constituído por 29 matrizes selecionadas para a produção de frutos e o segundo por 29 matrizes selecionadas para teor de óleo na polpa, totalizando 52 amostras, uma vez que seis matrizes pertencem aos dois grupos, para a extração de DNA genômico (Tabela 3.1).

A extração de DNA seguiu o protocolo CTAB proposto por Doyle & Doyle (1987) com algumas modificações (COSTA; OLIVEIRA, 2002). Após a extração do DNA foi procedida a quantificação do DNA das 52 amostras em gel de agarose a 1%, coradas com o corante brometo de etídio e comparadas com DNA padrão do fago lambda em três concentrações distintas (50, 100 e 200 ng/ul⁻¹), sendo auxiliada pelo programa Labimage. Em seguida, as amostras foram diluídas para a concentração de trabalho de 10 ng/ul e armazenadas em ultrafreezer, até o momento do uso nas PCR's com marcadores SSR.

Nas PCR's foram utilizados vinte locos SSR sendo oito desenvolvidos para *Bactris gasipaes* (pupunheira) e doze para *A. aculeatum* (Tucumã-do-Amazonas), os quais constam na Tabela 4.1. Para os locos de pupunheira (mBg 17, Ta = 52°C; mBg 41, Ta = 52°C; mBg 55, Ta = 52°C; mBg 58, Ta = 52°C; mBg 62, Ta = 52°C; mBg 66, Ta =

52°C; mBg 77, Ta = 57°C; e mBg 91, Ta = 52°C;) as reações foram realizadas para o volume final de 10 µl com adaptações do protocolo desenvolvido por Ramos et al (2012) e contendo 3,8 µl de H₂O mili-Q; 1,0 µl do Tampão 10X; 1,0 µl de MgCl₂ (50 mM); 1,0 µl de dNTP (100 µl de cada dNTP e 600 µl H₂O mili-Q); 1,0 µl de BSA (2,5 mg/ml); 0,5 µl de *primer* forward (2,5 mM/µl); 0,5 µl de *primer* reverse (2,5 mM/µl); 0,2 µl de Taq DNA polimerase (1U/5µl); e 1,0 µl de DNA total (10 ng/µl). As reações foram conduzidas em termociclador AB (Applied Biosystems) com fase inicial de desnaturação a 94°C por 2 min., mais 25 ciclos desnaturação (94°C por 10s; temperatura de anelamento de cada *primer*, por 20 s e 72°C por 30 s). Em seguida, a fase de extensão a 72°C por 10 min e, por fim, 20 ciclos (94°C por 10 min; 50°C por 20 s e 72°C por 30°C s).

Para os locos de Tucumã-do-Amazonas as reações foram feita também no volume final de 10 µl, com contendo 1,8 µl de H₂O mili-Q; 1,0 µl do Tampão 10X; 1,0 µl de MgCl₂ (50 mM); 1,0 µl de dNTP (100 µl de cada dNTP e 600 µl H₂O mili-Q); 1,0 µl de BSA (2,5 mg/ml); 1 µl de *primer* forward (2,5 mM/µl); 1 µl de *primer* reverse (2,5 mM/µl); 0,2 µl de Taq DNA polimerase (1U/5µl); e 2,0 µl de DNA total (10 ng/µl). As reações foram realizadas em termociclador AB (Applied Biosystems) de acordo com o protocolo desenvolvido por Ramos et al (2012) em duas fases: a primeira fase de desnaturação (68 °C, 2 min; 94 °C, 30 s) seguido por 30 ciclos (30 s a 92 °C, 35 s na temperatura de anelamento de cada *primer*, 30 s à 68 °C); o segundo passo consistiu de 15 ciclos (30 s à 92 °C, 30 s à 53 °C, 30 s à 72 °C) e extensão final à 72 °C durante 30 min.

Tabela 4.1. Identificação dos 12 locos microssatélites desenvolvidos para *A. aculeatum* e que será testada a transferibilidade para *A. Vulgare*.

Locos SSR	Nº de repetições	Sequência dos <i>Primers</i> (5'-3')	Ta (°C)
Aac01	(ATCACT) ₂	F: CACATGGTTCCTCCTCGTTC R: GCGAAAGGGTATAGTCAGCG	60
Aac02	(GCCATG) ₂	F: CGATTTGAGTCCGATGTG R: GCAGTTGTGTGTCTGGTTCT	60
Aac03	(TCCTAC) ₂	F: GCCTCCTTTAGTTCCTGCAC R: AGCATCGGACTTCCAGGT	60
Aac04	(GT) ₇ (GA) ₁₆	F: GCATTGTCATCTGCAACCAC R: GCAGGGGCCATAAGTCATAA	60

Aac05	(TACGCT) ₂	F: GTCCAATTCAGCTCGGCTT R: TTATGCAATGGTGGTGCTGT	62
Aac06	(TC) ₁₉ (AC) ₈	F: TCTGATCCATCTGGTTGTCTAA R: TGCATGGTGCTAGAGTAATCC	64
Aac09	(GT) ₆	F: CAAGCGCCTCCAAGGTAGAT R: GGAAAGAGAAGCAAGGAGTGG	66
Aac10	(CT) ₇	F: AGCCGTGAGTGAAGTCTTT R: AAGCCCAAACCTTCTTCCTCG	60
Aac11	(AC) ₅	F: AAAGGAACAACCCAAGAGGG R: TGGGGAGTGGACGTAAGTGT	60
Aac12	(GC) ₅ (AC) ₃ AAAC (AG) ₁₇	F: GCTCTGTAATCTCGGCTTCTT R: TCCAGTTCAAGCTCTCTCAGC	60
Aac13	(CA) ₇	F: CTAGACAACCCAAGAGAGGGG R: TTGGAGAGTGGATGTAGGTGC	60
Aac14	(CA) ₆ (CG) ₇ (CA) ₁₁ (GA) ₁₁	F: GGCCAGTTGTGTTGATGAAA R: TTAAGCCCCTGGTGAAAACA	55

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 7%, corados com nitrato de prata a 0,04% durante 2 h e 30 min.

A eletroforese vertical foi realizada para os vinte locos SSR no volume da reação, ou seja, a 10 µl, acrescidos de 5 µl da solução azul de xilenocianol (40%), e tampão TBE (Triz base 0,1 M; ácido bórico 1M e EDTA 0,5M) de corrida. No processo de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 7%, por 2 h e 30 min. Após a corrida, os géis foram corados com nitrato de prata 0,04%, secos em temperatura ambiente por 24 horas, escaneados e salvos para a contagem dos alelos.

A partir dos perfis alélicos gerados com os locos microssatélites aplicados nas amostras de DNA de *A. vulgare*, foi constituída uma matriz em planilha de Excel, na qual cada alelo de cada loco foi designado numericamente de 1 até o número máximo de alelos por loco. Foi utilizado o aplicativo NTSYS para estimar a matriz de similaridade com base no coeficiente de Jaccard, a divergência genética e a obtenção do dendrograma gerado pelo método UPGMA. O programa GenAlex 6 (PEAKALL; SMOUSE, 2006), foi utilizado para estimar a análise de variância molecular (AMOVA) utilizado a matriz de distância genética de Nei, foi realizada para avaliar a distribuição da variação genética entre as matrizes.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 20 locos SSR utilizados, apenas seis amplificaram produtos de qualidade (Figura 4.1), sendo quatro de pupunheira (*mBg17*, *mBg55*, *mBg58* e *mBg66*) e dois de tucumã-do-Amazônas (*Aac01* e *Aac03*) gerando ao todo 24 alelos, com média de 3,6 alelos por loco. O grupo de matrizes selecionadas para teor de óleo na polpa obteve o maior número de alelos por loco (3,8), valor esse um pouco acima da média do grupo (Tabela 4.2). A porcentagem de locos polimórficos foi igual para os dois grupos de matrizes (66,7%), sendo que quatro dos seis locos mostraram-se polimórficos.

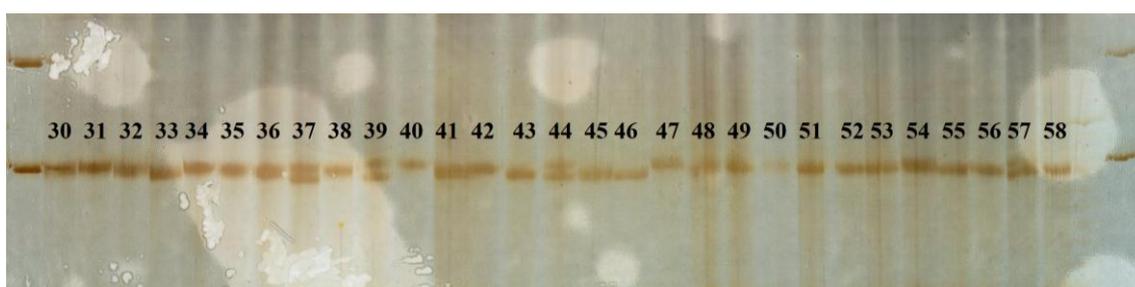


Figura 4.1. Perfil de gel desnaturante de poliacrilamida com loco *mBg 55* nas 29 matrizes de *A. vulgare* selecionadas para teor de óleo na polpa.

Tabela 4.2. Tamanho da amostra, número de alelos, número médio de alelos por loco e porcentagem de locos polimórficos nos dois grupos de matrizes de tucumazeiro (*Astrocaryum vulgare* Mart.) com base em seis locos microssatélites.

População	Nº de amostras	Nº de alelos	Nº médio de alelos/locos	% de locos polimórficos
Fruto	29	21	3,5	66,7
Óleo	29	23	3,8	66,7
Total	58	24	3,4	

As similaridades genéticas obtidas entre os genomas das 29 matrizes selecionadas para produção de frutos apresentaram ampla variação (0,286 a 1,0). Os pares de matrizes mais similares, ou seja, que apresentaram 100% de similaridade, foram Tuc-9 x Tuc-13 e Tuc-15 x Tuc-16, com o primeiro par procedente de Curuçá, PA e o segundo de Curuçá e Marcanã, PA. Por outro lado, as matrizes mais divergentes com 28,6% de

similaridade genética foram Tuc-6 x Tuc-33 e Tuc-7 x Tuc-39, sendo procedentes de Marudá x Salinópolis e Marapanim x Bragança. Tais similaridades permitiram a formação de dois grupos, cada um com dois subgrupos (Figura 4.2): O subgrupo Ia foi formado por uma matriz (Tuc-43) procedente de Bragança; o Ib) por oito matrizes a maioria de Bragança; já os subgrupos IIa e IIb) foram constituídos por dez matrizes de diferentes localidades. Ressalta-se que os pares de matrizes mais similares ocorreram nesses dois últimos subgrupos. A correlação cofenética obtida expressa boa confiabilidade na formação dos grupos ($r=0,77$). De um modo geral percebe-se que o agrupamento estruturado por esse tipo de marcador permitiu, de alguma forma, alocar as matrizes por local de coleta.

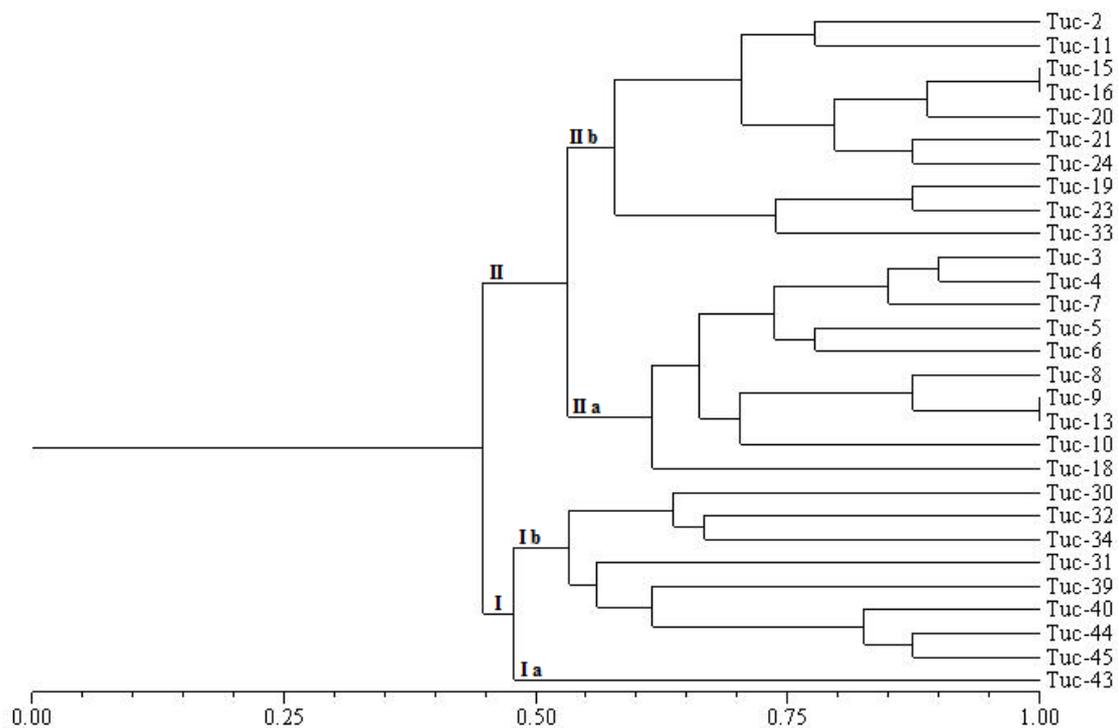


Figura 4.2. Dendrograma gerado a partir das similaridades genéticas obtidas pelo coeficiente de Jaccard entre os genomas das 29 matrizes de tucumã-do-pará, selecionadas para produção de frutos, com base em seis locos SSR.

Em relação às similaridades genéticas obtidas entre os genomas das 29 matrizes selecionadas para teor de óleo na polpa, a amplitude variou de 0,214 a 0,900. Nesse caso as matrizes mais similares foram Tuc-38 x Tuc-41, ambas representantes de Bragança. Enquanto as mais divergentes foram Tuc-22 x Tuc-25 procedentes de Primavera e Salinópolis, respectivamente. Os 406 pares de matrizes obtidos permitiram

a formação, também, de dois grupos, com o grupo II apresentando, pelo menos, dois subgrupos (Figura 4.3), quais sejam: I) formado por três matrizes (Tuc-48, Tuc-49 e Tuc-50), procedentes de duas localidades maranhenses; O subgrupo IIa) por quatro matrizes representantes de Igarapé Miri, Salinópolis e Bragança; e o subgrupo IIb) o maior deles, sendo formado por 22 matrizes de diferentes localidades. Pode-se perceber nesse dendrograma que houve tendência de agrupamentos das matrizes por local de coleta. O valor cofenético também foi considerado bom ($r=0,73$), o que representa considerável confiabilidade na formação dos grupos.

De um modo geral, percebe-se que os 24 alelos amplificados permitiram agrupar as seis matrizes coincidentes na seleção de frutos e óleo (Tuc-2, Tuc-4, Tuc-5, Tuc-13, Tuc-34 e Tuc-43) em subgrupos distintos, tanto no dendrograma de frutos como no dendrograma de óleo. Tais resultados permitem inferir que essas matrizes possuem considerável divergência genética, sendo os marcadores SSR robustos na quantificação da divergência.

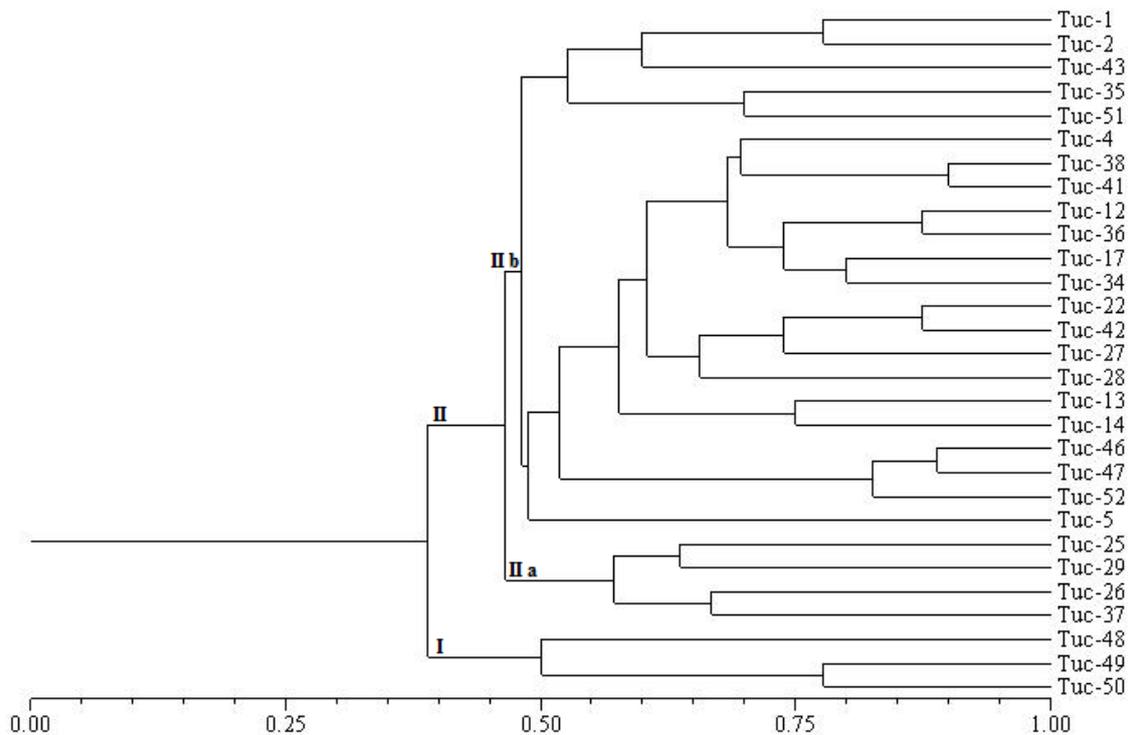


Figura 4.3. Dendrograma gerado a partir das similaridades genéticas obtidas pelo coeficiente de Jaccard entre os genomas das 29 matrizes de tucumã-do-pará, selecionadas para teor de óleo na polpa, com base nos seis locos SSR.

O número de alelos observados nas matrizes selecionadas para fruto e para teor de óleo foi de 3,667 e 4,167, respectivamente, indicando distribuição semelhante dos alelos nas matrizes representantes dos dois grupos (Tabela 4.3). O número efetivo de alelos (N_e) apresentou valores próximos 2,31 (matrizes frutos) e 2,44 (matrizes óleo), essa estimativa reflete o número de alelos necessários dentro de um loco para manter o nível atual de heteroziguidade (MURAWSKI ; BAWA, 1994). Desse modo, pode-se inferir que nos dois grupos de matrizes de *A. vulgare* ocorra nível considerável de heteroziguidade. A heteroziguidade observada (H_o) também não variou entre os grupos de matrizes de tucumanzeiro com valor igual a 0,368. Esse valor pode ser considerado baixo e reflete que a espécie ocorra em baixa densidade em populações naturais, pois o maior número de indivíduos pode permitir o maior número de recombinações, gerando altos níveis de diversidade genética.

A heteroziguidade esperada (H_e) foi um pouco maior que a observada e apresentou pequena variação entre as matrizes selecionadas para frutos e óleo, sendo de 0,429 e 0,473, respectivamente. Tais valores foram superiores aos da heteroziguidade observada, revelando um excesso de homozigotos, que é evidenciado pelos valores positivos do índice de fixação nas matrizes dos dois grupos refletindo um alto índice de endogamia, principalmente nas matrizes de frutos que obtiveram o valor 0,205.

Tabela 4.3. Estimativa de variabilidade genética em dois grupos de matrizes de tucumanzeiro (*A. vulgare*) selecionadas para produção de frutos e teor de óleo na polpa, utilizando seis locos SSR.

Grupos	Na	Ne	I	Ho	He	F
Óleo	3,667 (1,145)	2,310 (0,572)	0,795 (0,262)	0,368 (0,153)	0,429 (0,127)	0,072 (0,269)
Fruto	4,167 (1,195)	2,440 (0,583)	0,896 (0,251)	0,368 (0,153)	0,473 (0,113)	0,205 (0,292)

Na: número de alelos observados; **Ne:** número efetivo de alelos; **I:** Índice de Shannon; **Ho:** heteroziguidade observada; **He:** heteroziguidade esperada; **F:** índice de fixação. ; (): desvio padrão.

A análise de variância molecular (AMOVA) obtida com base nos 24 alelos gerados pelos seis locos SSR consta na Tabela 4.4. Verifica-se que 26,78% da variância total foi detectada entre os grupos de matrizes, enquanto que 73,22% ficou retida dentro dos grupos, demonstrando que a diferenciação genética foi maior dentro de cada grupo de seleção, podendo-se inferir que a maior variabilidade genética ocorra dentro das seleções. Oliveira e Silva (2008) obtiveram resultados semelhantes no estudo de diferenciação genética por marcadores SSR em genomas de acessos de *Euterpe*

oleraceae e relataram que esses resultados são comuns em plantas alógamas, o que pode ser o caso do tucumanzeiro. Ramos (2014), também observou resultados parecidos ao estudar genomas de *A. aculeatum*, confirmando que a variação genética dentro de populações é maior que entre elas. Mas, resultados divergentes também foram encontrados na literatura, como os resultados obtidos por Isensee et al. (2007), quando analisaram indivíduos de populações comerciais e melhoradas geneticamente de *Bactris gasipaes* e observaram alta similaridade entre os genótipos com base em marcadores RAPD.

Tabela 4.4. Análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro de dois grupos de matrizes de tucumanzeiro (*A. vulgare*) com base em sete locos SSR.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Componente de variação	Porcentagem%
Entre grupos	1	7,586	7,586	0,102	26,78%
Dentro de grupos	56	93,000	1,661	0,279	73,22%
Total	57	100,586	9,247	0,381	100%

As estimativas das estatísticas F de Wright (1951) para os seis locos nos dois grupos de seleção de matrizes de *A. vulgare* indicam que há a ocorrência de endogamia nas matrizes dos dois grupos, pois os valores observados foram positivos. A endogamia total (Fit) foi de 0,257, a estimativa da endogamia devido ao sistema reprodutivo ou intrapopulacional (Fis) foi igual a 0,202, valor este que foi maior em relação à endogamia devida à subdivisão (Fst) com 0,069, ou seja, afirmando que a variabilidade genética está dentro de cada seleção. Esse resultado é extremamente interessante, pois a partir dele espera-se obter progênies de tucumanzeiro heterogêneas em relação às características de produção e alto teor de óleo.

O fluxo gênico (Nm) representa movimentação de genes em populações e inclui todos os mecanismos que resultam na movimentação dos alelos de uma população para outra (SLATKIN, 1981; NEIGEL, 1997). No caso das matrizes da espécie em foco, cujas sementes apresentam longa dormência nas sementes facilita a ocorrência de sobreposição de gerações sucessivas, o que funciona como um mecanismo de fluxo gênico no tempo, isso acaba aumentando os valores de Nm. Assim, a taxa fluxo gênico para *A. vulgare* se mostrou alta (3,382), indicando que existe um grande movimento de genes entre as matrizes selecionadas nos dois grupos. Tais resultados sugerem que as

localidades de algumas matrizes podem contribuir para este fato, pois são próximas geograficamente.

4.4 CONCLUSÃO

Os locos SSR demonstram boa amplificação nos genomas das matrizes de tucumanzeiros selecionadas para produção de frutos e teor de óleo na polpa, inclusive pelo fato de poucos locos conseguirem identificar matrizes completamente similares.

As matrizes selecionadas para teor de óleo apresentam maior variabilidade que as de fruto, sendo que as seis matrizes coincidentes dos dois tipos de seleção expressam considerável divergência.

REFERÊNCIAS

- BATUGAL, P.; RAO, V.R.; OLIVER, J. Coconut Genetic Resources. **International Plant Genetic Resources Institute** – Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO), Serdang, Selangor DE, Malaysia. 2005
- BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P. S.; BRONDANI, R. V.; Marcadores microssatélites em espécies vegetais – Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em espécies vegetais tropicais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, p. 46-50, 2003.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220 p. 1998.
- ISENSEE, J. M. F.; VIDAL, P. O.; GAIOTTO, F. A. **Caracterização genética entre pupunheiras cultivadas no sul da bahia por marcadores RAPD**. *Magistra*, v. 19, n. 4, p. 304-310, out./dez., Cruz das Almas-Ba, 2007.
- LIMA, R. R., L. C. TRASSATO & V. COELHO. O tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.). Principais características e potencialidade agroindustrial. Boletim de Pesquisa 75. Belém: EMBRAPA-CPATU. 1986
- LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, 397-401, 1989.
- MEDEIROS, C. F. L.; CARDOSO, M. A.; FERREIRA, P. C. G. Uso de microssatélites em estudos de biologia da conservação. **Floresta e Ambiente**, v. 13, n. 2, p. 25 – 36, 2006.
- MURAWSKI, D. A.; BAWA, K. S. Genetic structure and mating system of *Stemonoporus oblongifolius* (Dipterocarpaceae) in Sri Lanka. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 81, n. 2, p. 155-160, Feb. 1994.
- NEIGEL, J. E. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. **Annual Review Ecology Systematics**, Palo Alto, v. 28, p. 105-128, 1997.
- OLIVEIRA, E. J. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.)**. 2006. 152p. Tese (Doutorado em agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- OLIVEIRA, M. do S. P. de; SANTOS, J. B. dos; AMORIM, E. P.; FERREIRA, D. F. Variabilidade genética entre acessos de açaizeiro utilizando marcadores microssatélites. **Ciênc. agrotec., Lavras**, v. 34, n. 5, p. 1253-1260, set./out., 2010.

OLIVEIRA, M. do S. P. de; SILVA, K. J. D. E. Diferenciação genética entre procedências de açazeiro por marcadores RAPD e SSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal - SP, v. 30, n. 2, p. 438-443, Junho, 2008.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENEALX 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. **Mol. Ecol. Notes**, 6:288–29, 2006.

PESCE, C. **Oleaginosas da Amazônia**. 2 ed., rev. e atual. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi; Brasília: Ministério do Desenvolvimento Agrário, 2009.

RAMOS, S. L. F.; MACÊDO, J. L. V. DE; LOPES, M. T. G.; BATISTA, J. S.; FORMIGA, K. M.; SILVA, P. P. DA; SAULO-MACHADO, A. C.; VEASEY, E. A. **Microsatellite loci for tucumã of amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) and amplification in other arecaceae**. American Journal of Botany. 2012.

RAMOS, S. L. F. **Estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais de tucumã-do-Amazônias por meio de microssatélites visando o manejo e conservação da espécie**. 2011. 120f. Dissertação (Doutorado em Ciências) - Escola Superiores de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ, São Paulo, 2014.

RIBEIRO, F. E.; BAUDOUIN, L.; LEBRUN, P.; CHAVES, L. J.; BRONDANI, C.; ZUCCHI, M. E.; VENCOVSKY, R. Population structures of Brazilian tall coconut (*Cocos nucifera* L.) by microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, 33, 4, 696-702p. Sociedade Brasileira de Genética. Printed in Brazil. 2010.

SANTANA, I. B. B.; OLIVEIRA, E. J. de; SOARES FILHO; RITZINGER, W. dos S. R.; AMORIM, E. P.; COSTA, M. A. P. de C.; MOREIRA, R. F. C. Variabilidade genética entre acessos de Umbu-Cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira Fruticultura**, Set, v.33, n.3, p.868-876, 2011.

SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v. 9, n. 5, p. 615–629, 2006.

SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 16, p. 393-430, 1985.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, n. 17, p.6463-6471, 1989.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **Am. J. Hum. Genet.**, n. 44, p.273-283, 1989.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, New York, v. 15, p. 395-420, 1951.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PARTANELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. V.; PINHEIRO, J. B.; BRONDANI, C.; VENCOVSKY, R. Transferability of microsatellites markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, n. 4, p. 512-514, 2002.

CONCLUSÕES GERAIS

Os marcadores ISSR e SSR demonstram boa amplificação nos genomas de matrizes de *Astrocaryum vulgare* selecionadas para a produção de frutos e teor de óleo na polpa, inclusive os poucos locos SSR utilizados nas análises, discriminam matrizes similares e indicando matrizes com considerável divergência genética.

Os marcadores SSR mostram-se mais eficientes que os ISSR nas análises genéticas, inclusive identificando possíveis duplicatas entre as matrizes selecionadas para produção de frutos.

O grupo de matrizes selecionadas para teor de óleo na polpa apresenta maior variabilidade genética que as do grupo de seleção para frutos, as seis matrizes coincidentes nesses dois tipos de seleção apresentam considerável divergência, podendo ser melhoradas através da seleção recorrente intrapopulacional.

Além disso, esses marcadores demonstram que a grande diferenciação genética está contida dentro das populações, com ampla variabilidade genética entre as matrizes do mesmo grupo de seleção.