

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E SISTEMA DE REPRODUÇÃO
EM PROGÊNIES ELITES DE PUPUNHEIRA INERME
(*Bactris gasipaes* KUNTH) COM MARCADORES
MICROSSATÉLITES: IMPLICAÇÕES PARA O
MELHORAMENTO DO PALMITO**

DORIANE PICANÇO RODRIGUES

MANAUS

2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA**

DORIANE PICANÇO RODRIGUES

**DIVERSIDADE GENÉTICA E SISTEMA DE REPRODUÇÃO
EM PROGÊNIES ELITES DE PUPUNHEIRA INERME
(*Bactris gasipaes* KUNTH) COM MARCADORES
MICROSSATÉLITES: IMPLICAÇÕES PARA O
MELHORAMENTO DO PALMITO**

**Tese apresentada ao Programa Multi-
Institucional de Pós-Graduação em
Biotecnologia/Universidade Federal do
Amazonas, como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia, área de concentração:
Agroflorestal**

Orientador: Doutor Charles Roland Clement

Co-Orientador: Doutor Spartaco Astolfi Filho

Manaus

2007

Ficha Catalográfica
(Catalogação na fonte realizada pela Biblioteca Central - UFAM)

Rodrigues, Doriane Picanço

R696d Diversidade genética e sistema de reprodução em progênies elites de pupunheira inerme (***Bactris gasipaes*** Kunth) com marcadores microssatélites: implicações para o melhoramento do palmito / Doriane Picanço Rodrigues . - Manaus: UFAM, 2006.

103 f.; il.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2006.

Orientador: Prof. Dr. Charles Roland Clement

Co-Orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

1. Pupunheira - Cultivo 2. Melhoramento genético 3. Biologia Molecular 4. Palmito I.Título

CDU 634.61(811.3)(043.2)

DORIANE PICANÇO RODRIGUES

**DIVERSIDADE GENÉTICA E SISTEMA DE REPRODUÇÃO
EM PROGÊNIES ELITES DE PUPUNHEIRA INERME
(*Bactris gasipaes* KUNTH) COM MARCADORES
MICROSSATÉLITES: IMPLICAÇÕES PARA O
MELHORAMENTO DO PALMITO**

**Tese apresentada ao Programa Multi-
Institucional de Pós-Graduação em
Biotecnologia/Universidade Federal do
Amazonas, como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia, área de concentração:
Agroflorestal**

Aprovada em 28 de setembro de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Izeni Pires Farias

Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. Dr^a. Marilene Leão Alves Bovi

Instituto Agronômico de Campinas

Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Gomes Lopes

Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Rogério Gribel

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Aos meus pais Jonatas e Ana, aos meus irmãos Junior e Gláucio, ao meu esposo Bergson e ao meu primogênito Davi pelo incentivo para a realização deste trabalho, ofereço.

A Tia Ordene (*In memorian*)

Dedico

AGRADECIMENTOS

À DEUS que é fonte de inspiração e sabedoria.

Ao Dr. Charles Roland Clement, pela orientação, apoio e incentivo, e especialmente por ter acreditado em mim em mais este trabalho, impulsionando meu desenvolvimento científico e profissional, e ainda pela boa amizade ao longo destes anos de convivência.

Ao Dr. Spartaco Astolfi Filho pelos ensinamentos, orientação, incentivo, amizade e, sobretudo, pela humildade no repasse de seus conhecimentos.

À Dra. Ana Ciampi pelo auxílio na confecção da biblioteca de microssatélites, pela hospitalidade durante a estadia em Brasília e pela amizade.

Ao Dr. Kaoru Yuyama pela colaboração e orientação na coleta do material vegetal.

À Dra. Izeni Pires Farias e ao Dr. Tomas Hrbek pela amizade, incentivo, e pelo auxílio nas análises genéticas e na discussão dos resultados.

Ao Dr. Alexandre Sebbenn pela contribuição nas análises genéticas e discussão dos resultados, sempre pronto a colaborar.

Ao Dr. Kermit Ritland pelos esclarecimentos nas análises com o programa MLTR.

À Dra. Maristerra Lemes e ao Dr. Rogério Gribel pelo auxílio nas análises do sistema de reprodução e pelos esclarecimentos nas discussões.

À Dr. Marilene Leão Alves Bovi (*in memorian*) pela sua contribuição na revisão do manuscrito.

Ao Dr. Eduardo Ossamu Nagao por disponibilizar a estrutura do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetal para realização de uma das etapas do trabalho, pelos aconselhamentos e auxílios prestados sempre que necessário.

Ao Dr. José Odair Pereira pelo estímulo, amizade e apoio.

Ao Prof. Hélio Maia (*in memorian*) pelo grande incentivo, e exemplos de humildade e generosidade.

À Universidade Federal do Amazonas e ao Departamento de Biologia, incluindo os professores e funcionários, pela oportunidade de realização deste trabalho e por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao Sr. Wanders B. Chávez Flores pela coleta do material na região de Yurimáguas, pelas discussões e sugestões neste trabalho.

A SUFRAMA e a FAPEAM pela concessão da Bolsa de estudo.

Ao CNPq (PTU 1 46.9889/00-4) e FAPEAM (PIPT 215087/2003) pelos recursos financeiros.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pela disponibilidade do material e aos funcionários do Banco de Germoplasma de Pupunha do INPA (Estação de Fruticultura) pela ajuda na coleta de material.

Aos funcionários e colegas do Laboratório de Tecnologia de DNA da Universidade Federal do Amazonas, especialmente a Dina, e ao Jhonson pelo auxílio nas genotipagens.

À amiga Christina Vinson pela ajuda na confecção da biblioteca de microssatélites e pelos momentos de convivência e troca de experiências em Brasília.

Ao biólogo Cirlande Cabral Silva pela ajuda nas extrações de DNA.

À Profa. Rozana Medeiros Galvão pelos momentos agradáveis de convivência e pela ajuda direta na confecção da tese.

Aos amigos e colegas do curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas pelas discussões científicas, pelos momentos agradáveis e paciência nos momentos difíceis.

Aos meus amigos e amigas biólogos, Alessandra, Ellen, Christiany, Josiley, Lucivana, Obed, Roseane, Tatiana e Themis pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis.

Aos amigos do Grupo de Casais pelo incentivo e compreensão pelas vezes que não me fiz presente em nossas atividades.

Ao meu esposo Bergson pela ajuda na plotagem dos dados, pelo incentivo, carinho, compreensão e paciência durante a realização deste trabalho.

Ao meu reizinho 'Davi' pelos momentos constantes de alegria e felicidade.

A minha mãezinha 'Ana', que com amor e carinho cuidou de seu netinho nos momentos que eu estava ausente e ao meu pai Jonatas pelo incentivo e, principalmente carinho e dedicação.

Aos meus irmãos, Júnior e Gláucio, pelo auxílio com os programas computacionais.

Aos meus tios, tias e primos, pelo incentivo e motivação, especialmente a tia Diana pelos conselhos e palavras de apoio e estímulo.

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

AGRADEÇO

***A coragem não é a ausência do
medo e sim a presença da fé
apesar do medo.
(Mark Baker)***

RESUMO

A pupunheira cultivada (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes*) é uma palmeira domesticada que vem se destacando como produtora de palmito. A base genética para o agronegócio vem da raça primitiva Pampa Hermosa, Yurimáguas, Peru, que fornece a maioria absoluta das sementes usadas na expansão do agronegócio e nos programas de melhoramento no Brasil, devido a possuir plantas sem espinho que são mais produtivas que as de outras raças. O uso de marcadores moleculares possibilitará discriminar com maior confiabilidade entre populações e progênies, orientando a seleção de matrizes e a busca de vigor híbrido via maximização de heterozigosidade dentro da raça. Este trabalho avaliou a diversidade e a estrutura genética, as relações genéticas entre as progênies e o sistema de reprodução de pupunheira da raça Pampa Hermosa, usando oito **loci** microsatélites, para apoiar os programas de melhoramento que usam estes recursos genéticos. Foram coletadas amostras de três populações de pupunheira da raça Pampa Hermosa e do mercado de Yurimáguas mantidas no ensaio de progênies do INPA, sendo 12 progênies do rio Cuiparillo (n=140), nove do rio Shanusi (n=130), 12 do rio Paranapura (n=130) e 17 do mercado de Yurimáguas (n=168). A amostragem concentrou-se em plantas selecionadas (121) para comprimento do palmito e não selecionadas (447). Existe alta variabilidade genética nas progênies do ensaio, com média de 15,1 alelos por **loci** e diversidade total (H_T) igual a 0,82. Os oito **loci** apresentaram 12 alelos comuns e 26 alelos intermediários presentes em todas as populações e o mercado, e 83 alelos raros, sendo 14 privados, 10 esporádicos e 62 difundidos. As heterozigosidades observadas (H_o) no conjunto de plantas foram inferiores a heterozigosidade esperada (H_e) na maioria dos **loci**; no **locus** Bg02-08 H_o foi muito inferior, sugerindo forte excesso de homozigotos neste **locus**. A H_o foi menor em Shanusi (0,64) e maior em Paranapura (0,74). Os coeficientes de endogamia variaram entre populações e mercado, sendo maior em Shanusi (0,190) e menor em Paranapura (0,111). Detectou-se baixa divergência genética entre as populações e o mercado ($\theta=0,025$; $G_{ST}=0,019$ e $R_{ST}=0,018$), certamente devido ao alto fluxo gênico (9,8 migrantes por geração). A AMOVA detectou 82,8% do total da variação dentro das progênies, 16% entre as progênies dentro das populações e o mercado, e somente 1,3% entre as populações e o mercado, confirmando uma estrutura genética mínima e sugerindo que as populações e o mercado são altamente relacionadas. Este relacionamento foi confirmado pelos dendrogramas de distâncias (D_{AS}) das populações, o qual mostra maior proximidade entre as populações de Paranapura e Cuiparillo, e entre o mercado e Shanusi. O dendrograma das progênies mostra alta afinidade genética e formação de grupos independentes de sua área geográfica de origem.

As heterozigosidades observadas (H_o) e esperadas (H_e) foram altas para a maioria das progênies, evidenciando alta variabilidade genética dentro das progênies. O coeficiente de endogamia (f) para o conjunto de progênies não foi diferente de zero, evidenciando excesso de heterozigotos e confirmando a alta variabilidade observada pelas estimativas de heterozigosidade. A análise do sistema de reprodução revela que a espécie é predominantemente alógama. As altas taxas de cruzamento demonstram que as progênies são oriundas quase que exclusivamente por indivíduos provenientes de exocruzamento, provavelmente devido ao estágio fenológico (pico da safra) e ao sincronismo de floração associado ao comportamento do polinizador. Porém, as estimativas ($t_m - t_s$) foram significativas (0,101 a 0,202), evidenciando endogamia biparental, provavelmente decorrente da prática agrícola de plantar sementes de polinização aberta de poucas matrizes na mesma roça. A estimativa da correlação de paternidade foi baixa (variando de 0,051 a 0,112), indicando pequena proporção de irmãos-completos dentro das progênies e grande número de doadores de pólen (9 a 20) participando dos cruzamentos individuais. Portanto, as progênies do ensaio são compostas em sua maioria por meios-irmãos com elevada variabilidade genética, evidenciada pelo alto número de doadores de pólen, e sugere que a seleção para produção de palmito poderá ser baseada nos modelos clássicos de genética quantitativa aplicados para espécies exclusivamente alógamas. Essas informações serão utilizadas para orientar os cruzamentos entre e dentro de progênies/populações. Dois planos de melhoramento são factíveis com essa informação: melhoramento populacional, com cruzamentos entre plantas e acessos altamente divergentes; melhoramento por meio de seleção recorrente recíproca, com a criação de populações divergentes em termos morfométricos e genéticos.

Palavras-Chave: marcadores moleculares, ensaio de progênies, variação intrapopulacional, taxa de cruzamento

ABSTRACT

GENETIC DIVERSITY AND MATING SYSTEMS IN ELITE PROGENIES OF SPINELESS PEACH PALM (*Bactris gasipaes* KUNTH) USING MICROSATELLITE MARKERS: IMPLICATIONS FOR IMPROVEMENT FOR HEART-OF-PALM

The peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes*) is a domesticated Neotropical palm that is important as a cultivated source of heart-of-palm. The genetic base for this agribusiness is the Pampa Hermosa landrace, Yurimaguas, Peru, that supplies the absolute majority of the seeds used in the expansion of the agribusiness and the improvement programs in Brazil, because its plants are spineless and more productive than those of other landraces. The use of molecular markers will permit better discrimination among populations and progenies of the landrace, guiding the selection of elite individuals and the search for hybrid vigor via maximization of heterozygosity within the landrace. This study evaluated the genetic diversity, population structure, and genetic relations among progenies and populations in a progeny trial maintained at INPA, Manaus, Amazonas, as well as the mating system of the peach palm using eight microsatellite loci, to support the improvement programs that use these genetic resources. Samples from three populations of the Pampa Hermosa landrace and from the market of Yurimaguas were collected from 12 progenies from the Cuiparillo River (n=140), 12 from the Paranapura River (n=130), nine from the Shanusi River (n=130), and 17 from the market at Yurimaguas (n=168). The sampling concentrated on plants (121) selected for heart length, and included non-selected plants (447). High genetic variability exists in the progeny trail, with a mean of 15.1 alleles per locus and total diversity (H_T) equal to 0.82. The eight loci had 12 common alleles and 26 intermediate-frequency alleles found in all the populations and the market, and 83 alleles scattered among populations, with 14 private alleles. The observed heterozygosity (H_o) in the trail was less than the H_e in the majority of the loci; in locus Bg02-08 H_o was very inferior, suggesting a strong excess of homozygotes in this locus. The H_o was lowest in Shanusi (0.64) and highest in Paranapura (0.74). The inbreeding coefficient f varied among populations and market, and was highest in Shanusi (0.190) and lowest in Paranapura (0.111). Genetic divergence among the populations and the market was low ($\theta=0.025$; $G_{ST}=0.019$ and $R_{ST}=0.018$), certainly due to high gene flow (9.8 migrants per generation). The AMOVA detected 82.8% of the total variation within the progenies, 16% among the progenies within the populations and market, and only 1.3% among the populations and the market, describing a weak genetic structure and suggesting

that the populations and the market are highly related. This relationship was confirmed by the dendrograms of the D_{AS} genetic distances among the populations, with a greater proximity between the populations of Paranapura and Cuiparillo, and between the Mercado and Shanusi. The dendrogram of the D_{AS} genetic distances showed high genetic affinity among the progenies and the formation of groups independent of their geographic origin. The H_o and H_e were high for the majority of the progenies, confirming high genetic variability within the progenies. The inbreeding coefficient (f) for the progeny trial was not different from zero, confirming an excess of heterozygotes and confirming the high variability observed from the estimates of heterozygosity. The analysis of the mating system found that the species is predominantly allogamous. The high out-crossing rate demonstrates that the progenies are derived almost exclusively from individuals experiencing out-crossing, probably due to the harvest representing the peak of the flowering season and to the synchronism of flowering associated with the behavior of the pollinator. The estimates of crossing among relatives ($t_m - t_s$) were significant (0.101 to 0.202), suggesting some biparental inbreeding, probably due to the farmers' practice of planting open-pollinated seeds of only a few seed sources in the same plot. The estimate of paternity correlation was low (varying from 0.051 to 0.112), suggesting a small number of full sibs within the progenies and large number of pollen sources (9 to 20) participating in the crosses. The progenies of the trial are composed mainly of half sibs with great genetic variability, enhanced by the large number of pollen sources, and suggests that selection for heart-of-palm production could be based on the classic models of quantitative genetics applied to exclusively allogamous species. This information will be used to guide the crosses among progenies/populations. Two improvement plans are feasible with this information: population improvement, with crosses among highly divergent plants and progenies; by reciprocal recurrent selection, with the creation of divergent populations based on morphometric and genetic information.

Key-words: molecular markers, progeny trial, intra-population variation, out-crossing rate

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Mapa Político e Hidrográfico da região de Yurimáguas, Loreto, Peru, onde germoplasma de *Bactris gasipaes* inerme foi coletado em 1991.....

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Histogramas de distribuição das frequências alélicas de oito *loci* microssatélites em amostras de pupunheira (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes*) de três populações e do mercado (Yurimáguas, Peru)..... 55

Figura 2 - Estimativas dos parâmetros genéticos, baseado em oito *loci* microssatélites *versus* número de plantas por progênies analisadas de pupunheira (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes*) de três populações e do mercado (Yurimáguas, Peru)..... 56

CAPÍTULO 4

Figura 1 - Distribuição de frequências das estimativas de distância genética (D_{AS}) entre as 46 progênies selecionadas de pupunheira (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes*) inerme da raça primitiva Pampa Hermosa (Yurimáguas, Peru) mantidas em ensaio de progênies pelo INPA, Manaus, AM, Brasil..... 73

Figura 2 - Dendrograma baseado em distância genética (D_{AS}) mostrando as relações genéticas entre amostras de pupunheira (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes*) de três populações e do mercado (Yurimáguas, Peru) mantidas em ensaio de progênies pelo INPA, Manaus, AM, Brasil..... 74

Figura 3 - Dendrograma baseado em distância genética (D_{AS}) mostrando as relações genéticas de 46 progênies selecionadas de pupunheira (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes*) da raça primitiva Pampa Hermosa (Yurimáguas, Peru) mantidas em ensaio de progênies pelo INPA, Manaus, AM, Brasil..... 75

Figura 4 - Dendrograma baseado em distância genética (D_{AS}) mostrando as relações genéticas de 30 progênies selecionadas de pupunheira (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes*) da raça primitiva Pampa Hermosa (Yurimáguas, Peru) mantidas em ensaio de progênies pelo INPA, Manaus, AM, Brasil..... 76

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Characteristics of 10 microsatellite loci of <i>Bactris gasipaes</i> (Pampa Hermosa landrace, Yurimaguas, Peru, $n= 62$).....	43
--	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Classificação do número de alelos de acordo com sua frequência e distribuição entre amostras de pupunheira (<i>Bactris gasipaes</i> var. <i>gasipaes</i>) inerme de três populações e do mercado (Yurimáguas, Peru), considerando oito loci microssatélites.....	54
---	----

Tabela 2 - Índices de diversidade genética, coeficiente de endogamia e diferenciação genética de oito loci microssatélites para amostras de pupunheira (<i>Bactris gasipaes</i> var. <i>gasipaes</i>) inerme de três populações e do mercado (Yurimáguas, Peru).....	57
--	----

Tabela 3 - Matriz de divergência (F_{ST} – diagonal abaixo) e fluxo gênico [M (número absoluto de migrantes) = $2Nm$ – diagonal acima] entre amostras de pupunheira (<i>Bactris gasipaes</i> var. <i>gasipaes</i>) inerme de três populações e do mercado (Yurimáguas, Peru), considerando oito loci microssatélites.....	61
---	----

CAPÍTULO 4

Tabela 1 - Estimativa de diversidade genética e endogamia em 46 progênes selecionadas de pupunheira (<i>Bactris gasipaes</i> var. <i>gasipaes</i>) inerme da raça primitiva Pampa Hermosa (Yurimáguas, Peru) mantidas em ensaio de progênes pelo INPA, Manaus, AM, Brasil, com oito loci microssatélites.....	71
---	----

Tabela 2 - Distância de alelos compartilhados (D_{AS}) médias, mínima e máxima entre as progênes selecionadas de pupunheira (<i>Bactris gasipaes</i> var. <i>gasipaes</i>) inerme da raça primitiva Pampa Hermosa (Yurimáguas, Peru), mantidas em ensaio de progênes pelo INPA, Manaus, AM, Brasil.....	72
--	----

CAPÍTULO 5

Tabela 1 - Parâmetros de endogamia, parentesco e sistema de reprodução em três populações de pupunheira cultivada (<i>Bactris gasipaes</i> var. <i>gasipaes</i>).	86
--	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	16
1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
1.1 Características da espécie	20
1.2 Biologia reprodutiva.....	21
1.3 Domesticação.....	22
1.4 O uso e o potencial da pupunheira.....	23
1.5 Melhoramento genético para produção de palmito.....	24
1.6 Pupunheira inerme de Yurimáguas.....	26
1.7 Uso de marcadores moleculares no melhoramento de plantas.....	32
1.8 Marcadores microssatélites.....	38
2 NOVEL MICROSATELLITE MARKERS FOR <i>Bactris gasipaes</i> (PALMAE).....	41
3 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM PROGÊNIES SELECIONADAS DE PUPUNHEIRA INERME DA RAÇA PRIMITIVA PAMPA HERMOSA (YURIMÁGUAS, PERU) USANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	44
RESUMO.....	44
ABSTRACT.....	45
3.1 INTRODUÇÃO.....	46
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.2.1 Material vegetal e extração de DNA.....	49
3.2.2 Amplificação dos <i>loci</i> microssatélites.....	50
3.2.3 Análise genética dos dados.....	51
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
3.3.1 Diversidade alélica dos <i>loci</i> microssatélites.....	54
3.3.2 Diversidade genética entre e dentro de populações.....	59
3.4 CONCLUSÃO.....	62

4 RELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE PROGÊNIES SELECIONADAS DE PUPUNHEIRA INERME DA RAÇA PRIMITIVA PAMPA HERMOSA UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES: IMPLICAÇÕES PARA O MELHORAMENTO.....	63
RESUMO.....	63
ABSTRACT.....	64
4.1 INTRODUÇÃO.....	65
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	68
4.2.1 Material vegetal e extração de DNA.....	68
4.2.2 Amplificação dos loci microsatélites.....	68
4.2.3 Análise genética dos dados.....	69
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4.4 CONCLUSÃO.....	77
5 SISTEMA DE REPRODUÇÃO DE PUPUNHEIRA DA RAÇA PRIMITIVA PAMPA HERMOSA INFERIDO DE PROGÊNIES SELECIONADAS USANDO MICROSSATÉLITES.....	78
RESUMO.....	78
ABSTRACT.....	79
5.1 INTRODUÇÃO.....	80
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	82
5.2.1 Material vegetal e extração de DNA.....	82
5.2.2 Amplificação dos loci microsatélites.....	83
5.2.3 Análise genética.....	84
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
5.4 CONCLUSÃO.....	89
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
ANEXO A.....	103

INTRODUÇÃO

A pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) é uma palmeira domesticada pelos primeiros povos amazônicos e possui ampla distribuição geográfica como consequência. Os processos de distribuição e domesticação, combinado a um grande número de preferências humanas, resultaram na criação de muitas raças primitivas, as quais possuem características morfológicas, químicas e produtivas que poderiam ser usadas como bases genéticas para diferentes objetivos dentro de programas de melhoramento genético (CLEMENT & MORA URPI, 1987).

O potencial econômico da pupunheira inclui seu palmito e seu fruto para consumo humano direto (MORA URPI *et al.*, 1997). Atualmente a demanda principal é para o palmito de pupunheira, cujo mercado encontra-se em franca expansão no Brasil, com perspectivas para a ampliação de seu consumo interno e sua exportação (YUYAMA *et al.*, 2005), pois a pupunheira é bem adaptada a muitos ecossistemas brasileiros e responde muito bem ao manejo (BOVI, 2000). A partir da forte demanda para sementes de pupunheira inermes para produção de palmito um outro uso se destaca: o mercado de sementes de pupunheira (CLEMENT, 2000).

Nos programas de melhoramento genético para a produção de palmito de pupunheira existem três possíveis bases genéticas (CLEMENT, 1997): as populações de Yurimáguas (Peru; raça Pampa Hermosa); Benjamim Constant (AM, Brasil; raça Putumayo); e San Carlos (Costa Rica; raça Utilis). As populações da região de Yurimáguas, Peru, fornecem a maioria absoluta das sementes usadas na expansão deste agronegócio (BOVI, 1997), devido a serem quase inermes (CLEMENT *et al.*, 1988) e mais produtivas que outras populações (MORA URPI *et al.*, 1999).

Clement & Bovi (1999) mostraram o estado dos programas de melhoramento de

pupunheira no Brasil e identificaram os componentes de produção (plantas inermes, perfilhamento, rápido crescimento, comprimento do palmito > 45 cm) que precisam ser modificados pelos programas. No entanto, a maioria destes componentes de produção de palmito possui herdabilidades baixas (CLEMENT, 1995; FARIAS NETO & RESENDE, 2001). Neste caso a seleção assistida por marcadores moleculares poderá ser uma ferramenta poderosa para garantir os ganhos genéticos (STUBER, 1992) que serão necessários para justificar os programas de melhoramento genético de pupunheira no Brasil (CLEMENT, 2001).

A variabilidade genética é a base para qualquer programa de melhoramento. Portanto, conhecer os níveis e a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações/progênes de pupunheira inerme é fundamental para o estabelecimento de estratégias adequadas ao uso destes recursos genéticos e o direcionamento de cruzamentos, aumentando assim a eficiência dos próximos passos do programa de melhoramento genético de pupunheira no Brasil. Para o melhoramento, informações sobre as diferenças genéticas entre indivíduos de uma população e o estabelecimento de relações genéticas entre diferentes acessos de uma coleção de germoplasma são fundamentais para auxiliar o melhorista na tomada de decisões. A determinação da forma preferencial de acasalamento também é fundamental para a escolha do método de melhoramento mais adequado, pois existem métodos específicos para os diferentes sistemas de reprodução (DIAS & KAGEYAMA, 1982).

Atualmente os marcadores tipo microsatélites são a ferramenta preferida pelos melhoristas para este propósito, pois são multi-alélicos, tem expressão codominante e exibem herança mendeliana (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1996), facilitando a análise genética. Em plantas perenes, estes marcadores têm sido usados para avaliar a grau de heterozigosidade complementar em matrizes usadas para cruzamentos que buscam vigor híbrido

(GRATTAPAGLIA, 1999). Este uso é especialmente interessante na pupunheira, onde as análises isoenzimáticas detectaram pouca heterozigosidade (CLEMENT *et al.*, 1997), o que sugere que genes selecionados terão menos heterozigosidade que *loci* neutros, como a maioria dos microssatélites. Para avaliar variabilidade e heterozigosidade, os microssatélites serão mais eficientes que os marcadores dominantes (RAPD, AFLP), pois possibilitam a distinção entre o homozigoto e o heterozigoto.

Uma vez desenvolvidos, os microssatélites poderão ser muito úteis na valorização dos recursos genéticos de pupunheira disponíveis, já que poderão ser usados para gerar as informações sobre a estrutura genética com base nas estimativas das frequências alélicas e genotípicas, levando à conclusões sobre a magnitude e a distribuição da variabilidade entre e dentro das populações, o que irá aumentar a eficiência dos próximos passos do programa de melhoramento genético de pupunheira. Desta forma, o melhoramento da pupunheira pode seguir o caminho do melhoramento de outras espécies perenes e gerar resultados úteis mais rapidamente.

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar a variabilidade genética de progênes selecionadas de pupunheira inerme do ensaio de progênes da raça primitiva Pampa Hermosa, mantido pelo INPA, utilizando marcadores moleculares microssatélites. O capítulo 2 apresenta o protocolo de desenvolvimento e a caracterização dos marcadores moleculares microssatélites (artigo publicado na revista Molecular Ecology Notes). O capítulo 3 avalia os níveis e a forma como a variabilidade genética é mantida dentro do ensaio de progênes, através dos índices de diversidade genética. O capítulo 4 demonstra o grau de relacionamento entre as progênes, através de distâncias genéticas. O capítulo 5 estima as taxas de cruzamento para definir o sistema de reprodução predominante na pupunheira. Este trabalho gerou informações úteis que poderão ser utilizadas nos próximos passos do melhoramento genético para produção de palmito, para orientar os cruzamentos entre e dentro de

progênies/populações e as próximas decisões que possam ser tomadas no programa de melhoramento.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Características da espécie

A pupunheira cultivada (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes*) é uma palmeira cespitosa (multicaule) pertencente a família Palmae (MORA URPI *et al.*, 1997). Ocorre nos Trópicos Úmidos americanos desde Honduras ao norte, ao longo da costa do Atlântico na América Central e América do Sul até São Luís do Maranhão no Brasil, e ao longo da costa do oceano Pacífico do sul da Costa Rica ao norte do Peru (ALMEYDA & MARTIN, 1980).

O estipe pode atingir até 20 metros de comprimento e é dividido em nós, que são cicatrizes deixadas pelas folhas, e entrenós com presença de espinhos (CLEMENT, 1987), existindo algumas mutações sem espinho no estipe (inermes), selecionadas pelos primeiros povos em diversas áreas de ocorrência da espécie. O sistema radicular é fasciculado, como em outras monocotiledôneas, estendendo-se até 7 m do estipe e 2 m de profundidade. O diâmetro do caule varia de 15 a 30 cm e o comprimento dos entrenós de 1 a 30 cm (MORA URPI *et al.*, 1997). O ápice do estipe sustenta uma coroa de 12 a 25 folhas pinadas, dependendo das condições ambientais, estado fisiológico-nutricional e seu genótipo (CLEMENT, 1986a). As folhas tenras não expandidas, localizadas no centro da coroa, formam o palmito (MORA URPI *et al.*, 1997).

A inflorescência monóica aparece nas axilas das folhas senescentes, com flores unissexuadas masculinas e femininas protegidas por uma espata lignificada que emerge da axila foliar. Após a polinização, os cachos podem conter entre 50 e 1.000 frutos e pesar de 1 a 25 kg (MORA URPI *et al.*, 1997).

O estágio vegetativo juvenil da pupunheira dura em torno de três a quatro anos, quando começa o florescimento e, três meses após, a produção de frutos (MORA URPI *et al.*, 1997). A floração e a frutificação da pupunheira são sazonais, respondendo as variações

ecológicas de forma ainda não bem entendida. O fruto é uma drupa, usualmente de cor alaranjada, vermelho ou amarelo e pode ter estrias superficiais, pesando entre 10 e 250 g.

As pupunheiras cultivadas se desenvolvem melhor em solos férteis, ligeiramente argilosos e a uma precipitação superior a 2.000 mm, com boa drenagem, porém podem crescer em clima seco com sistema de irrigação por aspersão e com temperatura média de 24°C ou superior (MORA URPÍ, 1992). Hoje, a pupunheira é cultivada principalmente no Sudeste, sul do Nordeste, Centro-oeste e Amazônia.

1.2 Biologia Reprodutiva

A pupunheira é monóica, com flores estaminadas e pistiladas na mesma inflorescência; protógina, com flores pistiladas receptivas quando a espata se abre e flores estaminadas que liberam pólen ao abrir e caem 24 horas mais tarde; o ciclo de polinização dura três dias. Essa combinação sugere que a pupunheira é alógama (MORA URPÍ & SOLIS, 1980).

Segundo Mora Urpí & Solis (1980), existem três mecanismos de polinização na pupunheira: o primeiro efetuado por besouros, o segundo pelo vento e o terceiro pela gravidade, sendo este último limitado pela existência de um sistema genético de auto-incompatibilidade. No entanto, Clement & Arkcoll (1984) demonstraram que, se existe esse sistema, sua eficiência é altamente variável, pois observaram de 0% a 88% de autocompatibilidade em polinizações controladas na raça Putumayo plantada em Manaus, AM.

A polinização é realizada por besouros da família Curculionidae pertencente aos gêneros ***Andranthobius*** (América Central) e ***Phyllotrox*** (Amazônia) (MORA URPÍ, 1982; LISTABARTH, 1996), e Nitidulideos do gênero ***Epurea*** (LISTABARTH, 1996). São besouros pequenos com uma autonomia de vôo reduzida, entre 100 e 200 m (MORA URPÍ & SOLIS, 1980) até 400 e 500 m (MEXZON *et al.*, 1997 *apud* MORA URPÍ *et al.*, 1997).

Entretanto, Beach (1984) relatou a presença de besouros grandes na Costa Rica, Scarabaeideos do gênero *Cyclocephala*, que, até o presente, não têm sido observados polinizando a pupunheira na Amazônia.

Embora a pupunheira seja alógama, a autopolinização poderá ocorrer de três formas: dentro da mesma inflorescência (por intermédio de insetos, vento ou gravidade durante a abscisão das flores estaminadas), entre inflorescências do mesmo estipe (evento mais raro, pois as inflorescências normalmente abrem em seqüência, com alguns dias de intervalo), e entre inflorescências em estipes diferentes dentro da mesma touceira (provavelmente mais ou menos comum). Isto sugere que a autopolinização e, conseqüentemente, a endogamia e a redução de heterozigosidade nas progênies podem ser mais ou menos freqüentes (MORA URPÍ *et al.*, 1997).

A estrutura populacional da pupunheira parece ser composta de um número de subpopulações mais ou menos restritas. Assim, o tamanho efetivo das sub-populações poderia ser pequeno, e subpopulações geneticamente isoladas estão evoluindo (MORA URPÍ *et al.*, 1997). A estrutura natural é similar à estrutura sob cultivo, pois as roças dos primeiros povos tendem a ser pequenas e isoladas (CLEMENT, 1988). Essas considerações têm implicações importantes para a coleta, a conservação e o manejo de recursos genéticos da pupunheira, mas foram levantadas após a maioria das coleções terem sido realizadas.

1.3 Domesticação

Segundo Clement (1987), a pupunheira foi domesticada pelos primeiros povos americanos e sua distribuição se restringe às trilhas traçadas por esses povos. Esta distribuição permitiu que diferentes populações de pupunheira entrassem em contato, resultando em hibridizações que liberaram uma explosão de diversidade fenotípica e genotípica. As roças, relativamente isoladas no meio da floresta, recebiam poucas sementes, propiciando a fixação dos alelos responsáveis pelas características desejadas.

Este processo de distribuição e domesticação, combinado a um grande número de preferências humanas, resultou na criação de muitas raças primitivas. Estas raças são conjuntos de populações domesticadas, sempre cultivadas, definidas por uma combinação específica de recursos genéticos originais, distribuição geográfica restrita e história étnica associada (CLEMENT, 2000).

Na Amazônia foi proposta a existência de pelo menos oito raças de pupunheira e ao noroeste dos Andes pelo menos mais cinco raças (MORA URPI *et al.*, 1997). Acredita-se que existem mais raças de pupunheira a serem identificadas e descritas, pois a distribuição de pupunheira é muito maior de que a área com raças descritas (CLEMENT, 2000).

Clement & Mora Urpí (1987) sugeriram que diferentes raças poderiam servir como as bases genéticas para diferentes objetivos dentro do programa de melhoramento genético. Por exemplo, a raça Pampa Hermosa (perto de Yurimáguas, Peru) possui uma alta frequência de plantas inermes; esta raça e as populações circunvizinhas fornecem as sementes para o agronegócio de palmito de pupunheira no Brasil (BOVI, 1997). Ainda, a raça Putumayo (Brasil-Colômbia-Peru) possui frutos com muito amido; esta raça poderia fornecer matéria prima para um agronegócio de farinha para consumo humano, tanto no Amazonas como no Acre (CLEMENT, 1996).

1.4 O uso e o potencial da pupunheira

Clement & Mora Urpí (1987) discutiram cinco usos atuais e potenciais da pupunheira: (1) fruto para consumo humano direto, (2) farinha para panificação, (3) farinha para ração animal, (4) óleo vegetal e (5) palmito. Hoje, após as mudanças nas economias latino-americana e mundial, e de pesquisas sobre diversos aspectos da biologia, agronomia, química, tecnologia e economia da pupunheira, é possível avaliar o potencial econômico de cada uso, bem como identificar outros usos, como por exemplo: sementes e madeira (CLEMENT, 2000).

Atualmente a demanda principal do mercado é para o palmito da pupunheira, cujo mercado encontra-se em franca expansão no Brasil, com perspectivas para a ampliação do consumo interno e exportação (YUYAMA *et al.*, 2005), pois a pupunheira é bem adaptada a muitos ecossistemas brasileiros e responde muito bem ao manejo (BOVI, 2000). No passado, o mercado de palmito para exportação advinha do palmito extraído da palmeira juçara (*Euterpe edulis*), que possui palmito de altíssima qualidade, mas, devido seu ciclo de produção longo e sua exploração predominante extrativista, encontra-se em vias de extinção econômica na Mata Atlântica. A pupunheira, por sua vez, apresenta um crescimento rápido, perfilhamento e produz palmito de alta qualidade, facilitando seu manejo e possibilitando sua instalação em áreas de cultivo (BOVI, 2000).

A partir da forte demanda para sementes de pupunheira inermes para produção de palmito, outro uso se destaca: o mercado de sementes de pupunheira (CLEMENT, 2000). Este mercado era atendido pela importação de sementes de Yurimáguas, Peru (95% da demanda) e Manaus, AM (5%). Em 2000, o governo do Peru restringiu as exportações para poder incentivar esse agronegócio no Peru, causando uma diminuição dramática da oferta de sementes ao Brasil. Também, o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento e sua Agência de Vigilância Sanitária estão preocupados sobre a possibilidade de introduzir doenças ou pragas com as sementes, o que está atrasando negociações que facilitariam as importações uma vez que o governo peruano liberou as exportações novamente. A demanda anual de sementes é ao redor de 10 milhões de plantas ou 20 milhões de sementes, com valor estimado de R\$ 3 milhões. No entanto, somente 2.000 ha são plantadas, devido a perdas substanciais ocorridas nas várias etapas até o campo.

1.5 Melhoramento genético para produção de palmito

De acordo com Yuyama *et al.* (2002) os objetivos do melhoramento de pupunheira para produção de palmito são:

- ♦ rápido crescimento;
- ♦ mais de quatro perfilhos, com rápido crescimento;
- ♦ alta frequência de palmito comprido – mais de 45 cm; e
- ♦ plantas inermes.

No programa de melhoramento genético para a produção de pupunheira existem três possíveis bases genéticas (CLEMENT, 1997): as populações de Yurimáguas (Peru; raça Pampa Hermosa), as de Benjamim Constant (AM, Brasil; raça Putumayo), e as de San Carlos (Costa Rica; raça Utilis). No entanto, amostras destas três populações avaliadas por Clement *et al.* (1997) possuem pouca variabilidade isoenzimática, possivelmente devido à pressão seletiva intensa para serem inermes, tanto pelos agricultores como pelos pesquisadores. Mora Urpí & Clement (1988) sugeriram que as populações de Yurimáguas possuem genes de Benjamim Constant, o que foi confirmado por Adin *et al.* (2004), e Clement *et al.* (1997) mostraram que estas duas populações possuem a maioria de seus alelos isoenzimáticos similares. Se Yurimáguas e Benjamim Constant são excessivamente similares, o vigor híbrido poderá não se apresentar, e são estas duas populações que são mais bem representadas no BAG-Pupunha do INPA.

Clement & Bovi (1999) mostraram o estado dos programas de melhoramento de pupunheira para palmito no Brasil e também identificaram os componentes de produção citados acima, que precisam ser modificados pelos programas. No entanto, a maioria destes componentes de produção de palmito possui herdabilidades baixas (CLEMENT, 1995). Neste caso a seleção assistida por marcadores moleculares mapeados no genoma poderá ser uma ferramenta poderosa para garantir os ganhos genéticos (STUBER, 1992) que serão necessários para justificar os programas de melhoramento genético de pupunheira no Brasil (CLEMENT, 2001).

1.6 Pupunheira inerme de Yurimáguas

Das três populações importantes de pupunheira inerme, as populações de Yurimáguas (Loreto, Peru) se destacam por possuírem de 60-80% de plantas inermes e por se encaixar melhor no ideotipo (rápido crescimento, perfilhamento, plantas inermes e comprimento do palmito > 45 cm) de pupunheira para produção de palmito recomendado por Clement (1995). Estas populações são pertencentes à raça primitiva Pampa Hermosa.

A cidade Yurimáguas se encontra situada na margem ocidental do rio Huallaga, no departamento de Loreto, na Amazônia Peruana (Figura 1). O distrito de Yurimáguas ocupa ambas as margens do rio Huallaga, que forma o eixo do distrito. Os rios Paranapura, Shanusi, Yanayacu, Cotoyacu, Mondongo, Zapote e Cuiparillo desembocam no rio Huallaga dentro do distrito.

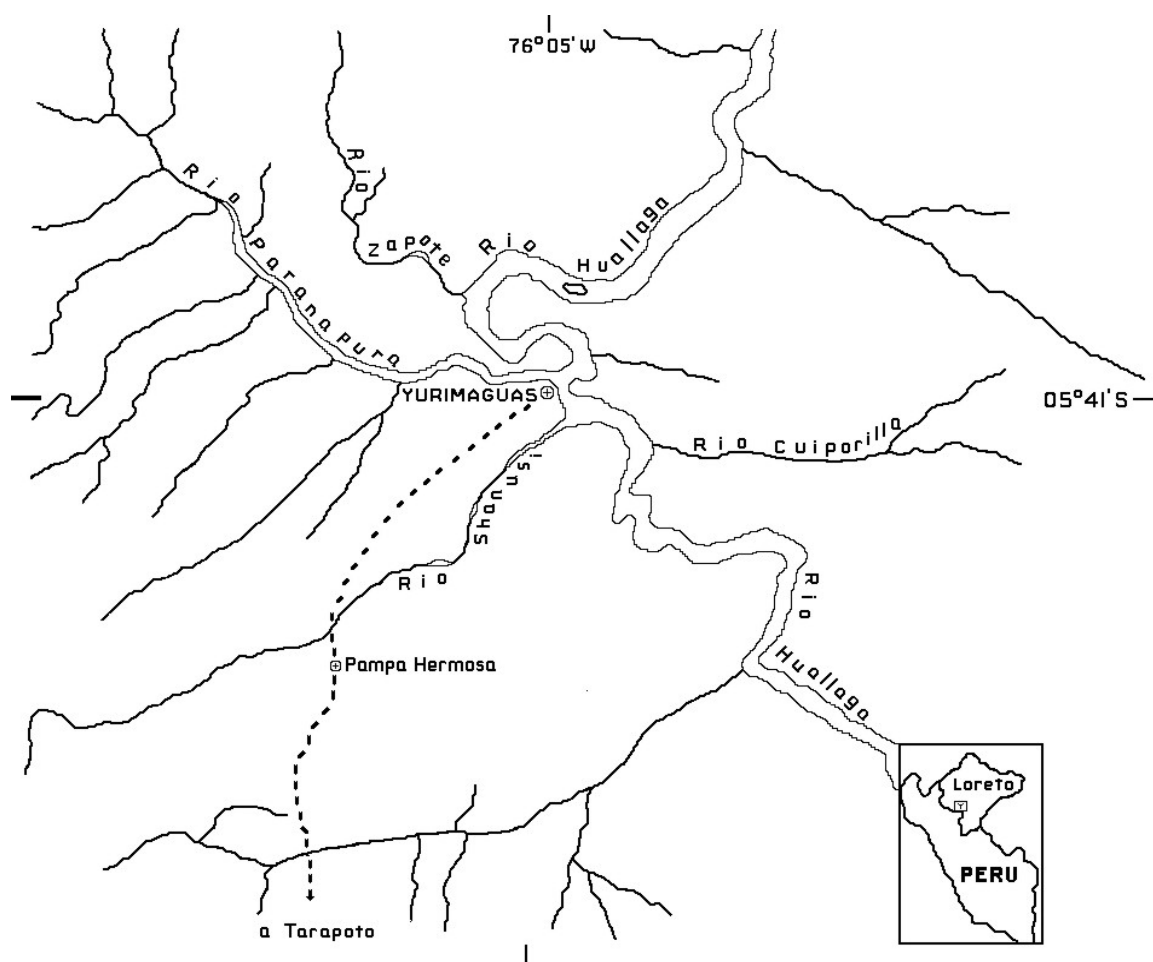


Figura 1. Mapa político e hidrográfico da região de Yurimáguas, Alto Amazonas, Loreto, Peru, onde germoplasma de *Bactris gasipaes* inerme foi coletado em 1991. Fonte: Clement *et al.* (2001)

Esta região foi alvo de três coletas efetuadas pelo INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) ao longo dos anos, uma em 1980 realizada por Wanders B. Chavez, uma em 1983 pela expedição financiada pela US-AID e a de 1991, financiada pelo CNPq e em conjunto com o IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) e UNESP - Jaboticabal. Após a coleta de 1983, Mora Urpí & Clement (1988) identificaram uma raça primitiva na região de Pampa Hermosa, rio Shanusi, e uma população híbrida ao redor da cidade de Yurimáguas, no rio Huallaga.

Hoje, exemplares coletados nestas prospecções estão representados no Banco Ativo de Germoplasma de Pupunha (BAG-Pupunha) mantido pelo INPA, uma coleção de pupunheira inerme procedente de Yurimáguas, e num ensaio de progênies. O material de prospecção de 1991 serve de base para dois programas de melhoramento, os do IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) e o do INPA.

Na prospecção de 1991, registrou-se apenas o local de coleta e a presença ou ausência de espinhos no tronco, em lugar de se usar os descritores de Clement (1986b). De acordo com Clement (Com. Pessoal) dos 410 acessos coletados, 391 acessos foram semeados (houve perda de 19 acessos no transporte), destes 316 germinaram e 279 foram levados ao campo. Foram realizadas avaliações em relação à germinação, pois esta característica seria importante para seleção de progênies precoces (YUYAMA & CHAVEZ, 1996), na qual a maioria dos acessos apresentou germinação tardia (> 60 dias), 50% dos acessos do rio Shanusi (raça Pampa Hermosa) não germinaram, e apenas 25 % foram precoces (< 30 dias para iniciar).

A porcentagem de mudas com espinhos no pecíolo/ráquis esteve abaixo de 5% em todas as populações (YUYAMA & CHAVEZ, 1996); esta porcentagem é menor que a esperada, considerando que as matrizes foram selecionadas por serem inermes e que existem entre 60 a 80% das plantas aparentemente inermes na região como um todo (CLEMENT *et al.*, 1988). Também de acordo com W. B. Chavez (dados não publicados), a maioria dos lotes

de sementes de Yurimáguas chegando ao mercado brasileiro possui entre 5 e 7% de mudas com espinhos.

Na avaliação preliminar do ensaio de progênes, em termos de distribuição micro-geográfica, sugere-se maior vigor das plantas do rio Shanusi, devido ao maior número de folhas verdes e ao comprimento da ráquis da terceira folha. No que diz respeito à precocidade e ao diâmetro do estipe na ocasião da extração do palmito, essa população teve maior porcentagem de acessos precoces e diâmetros maiores do que as outras. Estes caracteres são dependentes da fertilidade do solo e da densidade de plantas e/ou de estipes (número de perfilhos/planta), o que sugere uma maior absorção de nutrientes pelas plantas do rio Shanusi (Clement, 2001).

Outro caráter avaliado, o comprimento da coluna da copa, de onde se extrai o palmito, foi maior na população do rio Paranapura. Este comprimento tem relação direta com o comprimento do palmito, pois a seleção de plantas com palmito maior ou igual a 45 cm seguiu a mesma classificação.

Com base nesta avaliação preliminar, a população do rio Shanusi seria indicada como base para o melhoramento, pois concentra plantas inermes e alta taxa de crescimento relativo (uma medida de vigor). No entanto, os dados de comprimento da coluna da copa e do palmito, que foi maior na população do rio Paranapura, sugerem diferenças genéticas para estes componentes de produção. Se estes componentes apresentarem herdabilidades aceitáveis, a população do rio Paranapura poderia ser incluída no programa de melhoramento para aumentar a produção de palmito. De acordo com Mora Urpí *et al.* (1999) as populações de Yurimáguas em geral são melhores que outras populações para a produção de palmito, por isso todos os acessos estão sendo avaliados.

Em relação à estrutura genética de alguns caracteres de interesse econômico, os espinhos do estipe e da folha vêm causando muita discussão sobre o melhoramento de

pupunheira, pois alguns autores dizem que plantas com espinho são melhores que plantas sem espinho (inermes) e outros dizem que não importa (VILLACHICA *et al.*, 1996). Uma das hipóteses, que parece bem atrativa é: a presença de espinhos tem estrutura genética mendeliana simples (um gene com dois ou poucos alelos controla a expressão básica) e cada caráter poderia ter um ou mais genes modificadores também, portanto cada planta inermes seria homozigoto, com dois alelos recessivos. Mas o número de genes modificadores aumenta quando se analisa a distribuição dos espinhos na planta (estipe, pecíolo/ráquis, nervuras e borda dos folíolos, espata), a distribuição na parte sobre consideração, a quantidade por área, ao formato, ao comprimento, etc. Por esta razão Chávez Flores *et al.* (1990) partiram da suposição de que estes são caracteres quantitativos.

Chávez Flores *et al.* (1990) demonstraram diferentes valores de herdabilidade para a presença de espinhos (espinhos no pecíolo/ráquis tem uma herdabilidade média de $h^2=0,36$, *sensu restricto*), na beira do folíolo ($h^2=0,26$) e os espinhos na nervura central do folíolo ($h^2=0,14$), ou seja, o efeito do ambiente nestes caracteres é importante. Portanto, não são caracteres mendelianos simples, embora a ausência ainda possa ser recessiva e as plantas inermes ainda poderão apresentar depressão endogâmica (dados não comprovados), devido esta ser mais homozigota que uma planta com espinhos da mesma população.

Clement (1995) determinou que a herdabilidade de espinhos no pecíolo/ráquis variou de média (0,27) a zero, numa amostra altamente derivada da população de Benjamin Constant (AM, Brasil, raça Putumayo), a qual apresentou uma alta taxa de endocruzamento que reduz a herdabilidade. Adicionalmente, Clement (1995) confirmou uma observação de Chávez Flores *et al.* (1990) de que plantas juvenis podem ter mais espinhos no pecíolo/ráquis que plantas adultas. Este caráter tem menos herdabilidade ainda e plantas em ambientes mais variáveis e secos possuem mais espinhos quando adultas do que plantas em ambientes mais constantes e úmidos. O reconhecimento deste caráter é importante durante a caracterização de

germoplasma, pois sugere que uma caracterização tardia da planta poderá levar a classificá-la como uma planta inerme.

A estrutura genética de diversos parâmetros de crescimento (taxa de crescimento relativo - TCR, taxa de assimilação líquida - TAL, razão de área foliar - RAF) também foi estudada por Clement (1995) na amostra de Benjamin Constant em Havá durante diferentes intervalos de medição, sugerindo que o intervalo da 1ª à 2ª avaliação não tem nenhum sentido biológico para a planta, enquanto o intervalo da repicagem para o viveiro (semente recém germinada) ao 1º corte para palmito representa uma fase de crescimento (o estabelecimento, **sensu** TOMLINSON, 1990). Adicionalmente, Clement (1995) estimou herdabilidades para precocidade (dias entre o plantio e o corte), número de perfilhos, número de folhas, peso do palmito, comprimento do palmito, etc. Todos estes caracteres têm herdabilidades que variam amplamente dependendo das progênes usadas na análise e dos ambientes incluídos, mas a maioria apresentou herdabilidades baixas a médias.

Quanto à caracterização molecular, Clement **et al.** (1997) usaram 16 **loci** de nove enzimas para examinar três amostras populacionais altamente derivadas (Benjamin Constant [raça Putumayo], Yurimáguas [raça Pampa Hermosa], e San Carlos [raça Guatuso]) e encontraram heterozigosidades variando de 0,05 (San Carlos) a 0,14 (Yurimáguas). As baixas heterozigosidades encontradas e as identidades de Nei sugeriram que as populações são muito relacionadas.

Análises do DNA foram realizadas na Raça Pampa Hermosa, população do rio Shanusi, a partir de marcadores RAPD, na qual observou-se uma heterozigosidade estimada de 0,26, maior que as observadas com isoenzimas, e 75% de polimorfismo (RODRIGUES **et al.**, 2004a).

Mais recentemente estes marcadores foram utilizados para verificar se existiam outras raças, além da Pampa Hermosa, na região próxima de Yurimáguas. Foram analisados um total

de 120 plantas (30 de cada) das regiões do rio Paranapura, rio Shanusi, Alto rio Huagalla e rio Cuiparillo. Os 73 marcadores úteis demonstraram uma heterozigosidade estimada de 0,33. A falta de estrutura populacional nos grupos formados a partir das similaridades de Jaccard mostra que as populações não são muito distintas. Dos resultados das distâncias de Nei (1972) pode-se inferir que a base genética é muito reduzida, com todas as populações altamente relacionadas, portanto sugere-se uma só raça na região de Yurimáguas e que o nome Pampa Hermosa deve ser conservado (SILVA, 2004).

Adin *et al.* (2004) usaram AFLPs para analisar o fluxo gênico entre as populações nas comunidades indígenas e tradicionais ao longo dos rios Paranapura e Cuiparillo, e determinaram que o fluxo é tão alto que a diferenciação populacional não ocorre. Estes autores encontraram $N_m=5,8$ entre 12 populações manejadas por povos indígenas ao longo do rio Paranapura, $N_m=6,4$ entre quatro populações manejadas por povos tradicionais ao longo do rio Cuiparillo, e $N_m=4,8$ entre os rios. Esta informação corrobora com Silva (2004) de que a região de Yurimáguas contém apenas a raça Pampa Hermosa.

O ensaio de progênes de Yurimáguas mantido pelo INPA está sendo submetido ao método de seleção massal populacional. As seleções foram baseadas nas características especificadas por Yuyama *et al.* (2002) e avaliando os números de progênes selecionadas, aquelas que originaram do rio Cuiparillo, rio Huallaga e rio Paranapura tiveram as porcentagens semelhantes (entre 75 a 77% de progênes selecionadas) bem como plantas selecionadas dentro das progênes (7 a 8 % de plantas); por outro lado a do rio Shanusi teve menor porcentagem de progênes selecionadas (58,82%) e plantas selecionados (5,67% de plantas). Isto mostra que o número de folhas verdes não se correlaciona diretamente com o comprimento do palmito, pois a partição de assimilados do rio Shanusi pode aumentar o numero de folhas e comprimento de ráquis, mas não aumenta o comprimento de palmito tenro. As progênes do rio Paranapura têm maior porcentual de plantas acima de 63 cm,

enquanto o rio Shanusi teve maior porcentagem (41%) de palmito entre 54 a 64 cm, seguida do rio Paranapura (38%).

A etapa seguinte será de recombinação entre as progênes selecionadas para verificar o vigor híbrido. Entre as progênes diferentes, após o estudo de distância genética com auxílio de marcadores moleculares, serão avaliados o efeito da heterose, da capacidade geral (CGC) e específica de combinação (CEC). Paralelamente a esse estudo, serão identificadas as progênes com resistência a doenças e pragas (YUYAMA *et al.*, 2002).

Em programas de melhoramento de espécies alógamas, como a pupunheira, a busca de divergência genética dentro e entre populações, isto é a classificação de genitores em grupos heteróticos, poderia ser usada na realização de cruzamentos que irão ampliar a variância genética nas populações segregantes (MESSMER *et al.*, 1993). Além disso, o progresso genético nessas populações está diretamente ligado à manutenção da variabilidade genética, uma vez que quanto menor a variabilidade, menor os ganhos genéticos com a seleção (FALCONER, 1987). Dentre os métodos de melhoramento que poderiam ser utilizados para este fim, o método de população se baseia na associação entre a capacidade de competição ou agressividade dos indivíduos e a produtividade em uma população heterogênea (BORÉM, 1998), mas o risco deste método é a perda de genótipos desejáveis que mostram baixa capacidade de competição nos ensaios de progênes. Outra estratégia de melhoramento é o método de seleção recorrente recíproca que visa aumentar gradativamente a frequência de alelos favoráveis, além de manter a variabilidade genética a cada ciclo para selecionar em ciclos subseqüentes, para então estabelecer os grupos heteróticos (SOUZA JR., 2001).

1.7 Uso de marcadores moleculares no melhoramento de plantas

O uso de marcadores moleculares no melhoramento de plantas, tanto anuais como perenes, tem expandido rapidamente nos últimos anos. Este avanço tem sido acompanhado de

perto pelo grande desenvolvimento nas áreas da bioinformática e da genética quantitativa, que tem contribuído para o atual nível de conhecimento sobre a diversidade e a estrutura genética de várias espécies cultivadas, bem como de espécies silvestres. A aplicação dessas metodologias para acelerar e monitorar os programas de melhoramento genético tem permitido grandes avanços no desenvolvimento de variedades melhoradas (MILACH, 1998).

A escolha dos genitores e o planejamento dos cruzamentos são etapas de fundamental importância para o sucesso de um programa de melhoramento (BORÉM, 1998). Estas etapas podem ser auxiliadas por meio dos marcadores moleculares, que fornecem aos melhoristas informações genéticas adicionais e mais detalhadas dos genótipos, aumentando a probabilidade de obtenção de cultivares superiores. A identificação e seleção de genitores superiores são críticas em espécies perenes, como fruteiras e essências florestais, uma vez que o tempo para obtenção de uma cultivar melhorada é bastante longo.

Os marcadores tipo RAPD são ferramentas eficientes para o exame da variação genética porque são relativamente fáceis e baratos, revelam muita variabilidade distribuída em todo o genoma, mas são de expressão dominante em cada **lócus**, limitando a informação disponível (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). Já os marcadores tipo microssatélite são mais eficientes, embora mais difíceis e caros para desenvolver. São mais informativos porque exibem herança mendeliana, são multi-alélicos e tem expressão codominante (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996), facilitando a análise genética. Outras técnicas moleculares têm se destacado para acessar a variabilidade em plantas, como por exemplo, o marcador AFLP, que é acessível e gera grande número de marcadores polimórficos. No entanto, é do tipo dominante, apresentando menos informação por **lócus** quando comparado aos marcadores co-dominantes (SOUZA, 2001).

Estas tecnologias e outras são usadas para caracterizar e identificar cultivares, documentar a paternidade de cultivares ou híbridos inter e intra-específicos, e examinar as

relações genéticas entre acessos em coleções de germoplasma (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). Além disso, podem servir como marcadores para caracteres quantitativos, como o crescimento e a produtividade, e na construção de mapas genéticos (MILACH, 1998).

As informações geradas por esses marcadores irão contribuir diretamente nos estudos de variação genética em populações de uma espécie. Esses estudos envolvem basicamente duas questões: quantificar os níveis de variabilidade dentro das populações e caracterizar o nível de estruturação genética entre populações (HAMRICK, 1983).

A variabilidade genética intrapopulacional tem sido quantificada em termos de números de alelos por **lócus** (**A**), percentagem de **loci** polimórficos (**P**), heterozigosidade observada (**H_o**) e esperada (**H_e**) sob equilíbrio de Hardy Weinberg e índice de fixação (**f**) (HAMRICK, 1983). Estas estimativas caracterizam e comparam os níveis de diversidade genética dentro de cada população. Além disso, o índice de fixação (**f**) tem sido utilizado como uma medida de desvios do equilíbrio de Hardy Weinberg dentro de cada população.

A segunda questão, de particular importância para o melhoramento, refere-se à maneira pela qual a variabilidade genética é repartida entre e dentro das populações, ou seja, a estrutura genética das populações, a qual é resultante da ação de forças evolutivas, tais como: mutação, migração, seleção e deriva genética atuando dentro de cada população e espécie (HAMRICK, 1982). Em espécies com populações domesticadas a ação das forças evolutivas inclui a seleção humana, deriva devida ao tamanho de plantios, migração mediada por humanos e uma preferência para manter mutações curiosas ou interessantes, mesmo que a mutação reduza a adaptação da planta.

Para caracterizar a estrutura genética de populações três metodologias têm sido empregadas: estatísticas F, que fornecem os índices de fixação de alelos para o total das populações, média dentro e entre populações, com base em medidas de probabilidade de

identidade por descendência (WRIGHT, 1965; NEI, 1977); a análise de variância das frequências gênicas, que distribui a variabilidade genética em diversos níveis hierárquicos, considerando o processo amostral nas estimativas (COCKERHAM, 1969; WEIR, 1996); e a análise da diversidade gênica em populações subdivididas, que fornece, a partir de uma metodologia estatística simples, a proporção da variabilidade genética contida entre e dentro das populações e os níveis de heterozigosidade esperados para o total e a média das populações (NEI, 1973; 1977; 1987). Segundo Reis (1996), todas as três metodologias apresentam bases genéticas similares e são complementares quanto ao significado biológico, especialmente se os marcadores forem neutros, a amostragem aleatória e as populações forem originadas de uma única população ancestral.

Outra abordagem que irá auxiliar no entendimento da estrutura genética é a obtenção de informações sobre o sistema de reprodução da espécie, que determina como a informação genética é transferida de uma geração para outra (WRIGHT, 1921), permitindo entender a maneira como a variabilidade genética se organiza no espaço e no tempo. O sistema de reprodução pode ser caracterizado basicamente por dois modelos: o modelo aleatório e o modelo misto de reprodução (SEBBENN *et al.*, 2000). O modelo de cruzamentos aleatórios é o modelo de equilíbrio de Hardy Weinberg, que é o mais comum e mostra como as distribuições das frequências gênicas surgem de uma geração para outra; a pressuposição de cruzamentos aleatórios serve como padrão de referência, permitindo a comparação com os cruzamentos observados (CLEGG, 1980). No modelo de reprodução mista, a taxa de cruzamento *t* pode ser estimada por dois métodos: o primeiro baseado no equilíbrio de Endogamia de Wright – EEW, onde a pressuposição de EEW garante que toda a endogamia observada pode ser atribuída ao sistema de reprodução, ou seja, autofecundação e cruzamentos entre aparentados (VENCOVSKY, 1994; WEIR, 1996); e o segundo baseado nos genótipos *multilocus* observados em progênies de mães conhecidas (BROWN &

ALLARD, 1970; RITLAND & JAIN, 1981), que permite a obtenção de estimativas mais adequadas da taxa de cruzamento e tem sido o mais empregado, pois leva em consideração às combinações genotípicas envolvendo todos os **loci**. As estimativas são obtidas por máxima verossimilhança, e admite que as populações se reproduzem por autofecundações a uma taxa **s** e por cruzamentos aleatórios a uma taxa **t** (RITLAND & JAIN, 1981; RITLAND, 1990), permitindo a observação de cruzamentos não ao acaso (cruzamentos entre parentes e autofecundações).

A disponibilidade de dados de marcadores moleculares para diversas populações ou genótipos também permite o estabelecimento de estimativas de similaridade ou distâncias genéticas, que normalmente é proporcional ao tempo de divergência dos genótipos em relação a um ancestral comum (WEIR, 1996). De acordo com Milach (1998) é possível separar os estimadores de distância genética em dois grandes grupos: a) as distâncias geométricas, destacando as distâncias de Roger modificada, o índice de similaridade de Nei e Li, e a estimativa de distância D de Barbosa Neto **et al.** (1997), as quais variam de zero a um, o que facilita a interpretação dos resultados; b) as distâncias que requerem pressuposições genéticas, das quais a mais empregada é a distância de Nei, que mede as proporções de genes iguais entre e dentro de populações e é diretamente proporcional ao tempo de divergência das duas populações sob comparação. Apesar de ser utilizada em diversos trabalhos, esta distância não é a melhor opção para estudos visando o melhoramento de plantas, uma vez que pode variar de zero ao infinito; desta forma sua interpretação não é direta, podendo gerar confusões na comparação de diferentes genótipos.

A síntese de informações sobre a diversidade e a estrutura genética das populações, as estimativas das taxas de cruzamento e as relações genéticas poderão ser usadas para estabelecer estratégias de seleção de genótipos superiores e manutenção da variabilidade genética para uso em programas de melhoramento e conservação (MILACH, 1998).

Em pupunheira, marcadores RAPD foram usados para avaliar a hipótese da existência de sete raças primitivas na Amazônia (raça Pará, Putumayo, Solimões, Pampa Hermosa) e na América Central (Utilis, Tuíra, Guatuso) (RODRIGUES *et al.*, 2004a). A caracterização molecular validou a existência das raças Pará e Pampa Hermosa; neste caso as interpretações morfológicas e genéticas estão de acordo. A mesma caracterização sugeriu uma só raça na América Central (raças Utilis, Tuíra, Guatuso). Também na Amazônia, ao longo do rio Solimões, sugeriu uma só raça, em lugar de duas. Esta discriminação tem importância prática, pois é mais provável que hibridizações entre plantas de raças diferentes apresentem vigor híbrido do que hibridizações entre plantas da mesma raça, como observado no programa de melhoramento de dendê (*Elaeis guineensis*) na África (HARTLEY, 1977).

Em plantas perenes, estes marcadores têm sido usados para avaliar a grau de heterozigosidade complementar em matrizes usadas para cruzamentos que buscam vigor híbrido (GRATTAPAGLIA, 1999). Este uso é especialmente interessante na pupunheira, onde as análises isoenzimáticas detectaram pouca heterozigosidade (CLEMENT *et al.*, 1997). Para esta finalidade, os microssatélites serão mais eficientes que os RAPDs e os AFLPs, pois possibilitam a distinção entre o homozigoto e o heterozigoto.

A utilização da divergência genética para orientar a escolha dos parentais a serem intercruzados em programas de melhoramento visa obter maior efeito heterótico nas populações híbridas. Em espécies como o milho, a caracterização de linhagens em grupos heteróticos é de fundamental importância na escolha dos genitores para a obtenção de híbridos com elevado desempenho agrônômico. Medidas de distância genética por meio de RFLP têm sido utilizadas na classificação de linhagens de milho em grupos heteróticos, bem como a alocação de novas linhagens de origem desconhecida nos diferentes grupos (LIVINI *et al.*, 1992). A correlação entre as distâncias genéticas e a heterose para características importantes tem sido observada em canola (*Brassica napus*) (ALI *et al.*, 1995) e em mostarda (*Brassica*

sinapis) (SEKHON & GUPTA, 1995).

Análise da diversidade genética entre acessos de bancos de germoplasma tem gerado informações que otimizam a manutenção e o manejo das coleções básicas, facilitando o acesso dos melhoristas a novos conjuntos gênicos. Estes estudos têm sido conduzidos em palmeiras, como coco (*Cocos nucifera* L.) (PERERA *et al.*, 1999), tâmara (*Phoenix dactilifera*) (ZEHDİ *et al.*, 2004) e dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.) (HAYATI *et al.*, 2004), e tem contribuído para programas de melhoramento na manutenção e uso da variabilidade existente.

1.8 Marcadores microsatélites

Marcadores moleculares codominantes têm sido usados nos estudos genéticos de populações naturais e nos programas de melhoramento, auxiliando a seleção de genótipos superiores. Entre esta classe de marcadores, os marcadores seqüências simples repetidas (SSR) ou microsatélites são os que mais se aproximam ao marcador ideal para estudos de genética de populações (RAFASKI *et al.*, 1996). Isto se deve ao fato de tais marcadores possuírem características extremamente favoráveis para este fim (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). Dentre elas destacam-se:

- ◆ São abundantes e uniformemente distribuídos por todo o genoma;
- ◆ São tipicamente codominantes;
- ◆ São altamente multi-alélicos, apresentando o maior conteúdo informativo por *locus* entre todas as classes de marcadores moleculares;
- ◆ São obtidos através de amplificação via PCR;
- ◆ São automatizáveis em sistemas multiplex, o que permite avaliar rapidamente um grande número de indivíduos para um grande número de *loci* em pouco tempo;
- ◆ Podem ser transferidos dentro de espécies de um mesmo gênero;
- ◆ Uma vez desenvolvidos, podem ser compartilhados entre diferentes laboratórios.

Devido à expressão co-dominante e ao multi-alelismo, os marcadores SSR são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo na terminologia de marcadores moleculares. Por causa disso, toda e qualquer população segregante pode ser utilizada como população referência para estudos de ligação e mapeamento genético. Assim, a escolha da população para mapeamento não mais precisa ser feita com base na maximização da distância genética e sim visando à população mais informativa do ponto de vista das características biológicas ou econômicas de interesse (MILACH, 1998).

Apesar de todas estas vantagens demonstradas pelos microsatélites, a utilização em larga escala tem um custo elevado e requer tecnologias para o seu desenvolvimento. Um laboratório equipado com aparelhos utilizados em rotinas de biologia molecular necessários para este fim nem sempre é disponível nas instituições de pesquisa.

Para a obtenção dos pares de ‘primers’ que amplifiquem regiões repetitivas de microsatélites, são necessários passos de caracterização de abundância de diferentes motivos repetitivos (‘motifs’), construção de bibliotecas, sequenciamento do DNA e ampla triagem dos ‘primers’ construídos, visando identificar **loci** mais informativos. As principais aplicações de marcadores SSR têm sido em estudos de mapeamento genético, genética de populações e identificação individual em humanos, animais domésticos e plantas (CREGAN *et al.*, 1999; EVETT *et al.*, 1997). Os microsatélites em plantas são cerca de cinco vezes menos abundantes do que em humanos, onde ocorre um microsatélite (maior que 20 pb) a cada 6 Kb. Nas monocotiledôneas, é esperado um microsatélite a cada 65 Kb, enquanto nas dicotiledôneas, um SSR a cada 21 Kb. Em milho, estima-se que ocorra um SSR a cada 58 Kb (WANG *et al.*, 1994). Em plantas um dos primeiros trabalhos publicados descrevendo estes marcadores foi em espécies arbóreas tropicais (CONDIT & HUBBELL, 1991), na qual foram detectadas grande abundância de dinucleotídeos repetidos do tipo AG e AC no genoma de plantas. Powell *et al.* (1996) observaram que em animais e em humanos, a abundância de

microssatélites é superior em relação à encontrada em plantas. O tipo de dinucleotídeo repetido mais freqüente em plantas é AT seguido pelo AG e pelo AC (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996); entretanto os microssatélites desenvolvidos para motivos AT são raros devido a autocomplementariedade das sondas utilizadas durante o desenvolvimento dos marcadores com este tipo de dinucleotídeo repetido (RAFASKI *et al.*, 1996). A quantidade de AG e AC em plantas varia de espécie para espécie; em *Pinus*, por exemplo, a quantidade de AC é duas vezes maior que a de AG (ECHT & MAY-MARQUARDT, 1997). A maioria dos trabalhos apresenta “primers” que amplificam regiões de microssatélites dinucleotídeos, possivelmente devido estas regiões serem mais abundantes do que os tri e tetranucleotídeo.

Atualmente, muitos *loci* SSR estão descritos para espécies arbóreas como *Eucalyptus* ssp (BRONDANI *et al.*, 1998), incluindo palmeiras *Cocos nucifera* (RIVERA *et al.*, 1999), *Euterpe edulis* (GAJOTTO *et al.*, 2001), *Elaeis guineensis* (BILLOTTE *et al.*, 2001), e *Bactris gasipaes* (MARTÍNEZ *et al.*, 2002; BILLOTTE *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2004b). Todos estes trabalhos demonstram que *loci* SSR são altamente multi-alélicos e informativos para estudo de estrutura genética de populações, permitindo estimar com precisão heterozigosidade, distância genética, relações de parentesco e fluxo gênico.

Para pupunha estão disponíveis 40 *loci* microssatélites, dos quais 30 são altamente polimórficos e transferíveis para outras espécies do gênero *Bactris* (MARTÍNEZ *et al.*, 2002; BILLOTTE *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2004b). Alguns destes *loci* têm sido utilizados para análise de diversidade e estrutura genética de populações de pupunha cultivada e silvestre (COUVREUR *et al.*, 2006; COLE *et al.*, 2007; HERNANDEZ, 2005). Dos *loci* desenvolvidos por Rodrigues *et al.* (2004) serão utilizados oito *loci* para análise de diversidade genética e sistema de cruzamento das populações de pupunheira inerme da região de Yurimáguas no Peru, o que irá subsidiar os programas de melhoramento que utilizam este recurso.

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

Artigo publicado na revista Molecular Ecology Notes em 2004, como pré-requisito para defesa de tese de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas.

3 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM PROGÊNIOS SELECIONADAS DE PUPUNHEIRA INERME DA RAÇA PRIMITIVA PAMPA HERMOSA (YURIMÁGUAS, PERU) USANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES

RESUMO

A pupunheira cultivada (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes*) é uma palmeira domesticada com ampla distribuição nos trópicos úmidos americanos. As populações da raça primitiva Pampa Hermosa (Yurimáguas, Peru) fornecem a maioria das sementes usadas na expansão do agronegócio de palmito cultivado e nos programas de melhoramento no Brasil, devido a possuir plantas inermes e mais produtivas que as de outras raças. Oito **loci** microsatélites foram utilizados para avaliar a diversidade e a estrutura genética de progênies selecionadas de três populações de pupunheira da raça Pampa Hermosa (rio Cuiparillo [12 progênies; n=140]; Paranapura [12 progênies; n=130]; Shanusi [9 progênies; n=130]) e amostras coletadas no mercado de Yurimáguas (17 progênies; n=168) mantidas em ensaio de progênies. Um total de 121 alelos foi detectado, com média de 15,1 alelos por **locus**. A estimativa de diversidade total (H_T) foi de 0,82, similar à observada em outras espécies de palmeiras cultivadas, como coco (*Cocos nucifera* L.) e dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.). As heterozigosidades observadas (H_o) foram inferiores às esperadas (H_e) em todos os **loci**; no **locus** Bg02-08 H_o foi muito inferior, sugerindo forte excesso de homozigotos. A H_o foi menor em Shanusi (0,64) e maior em Paranapura (0,74). Os coeficientes de endogamia (f) variaram entre populações e mercado, sendo maior em Shanusi (0,190) e menor em Paranapura (0,111); estes índices de endogamia podem ser atribuídos à prática agrícola de plantar meios-irmãos nas roças. Detectou-se baixa divergência genética entre as populações e o mercado ($\theta=0,025$; $G_{ST}=0,019$ e $R_{ST}=0,018$), certamente devido ao alto fluxo gênico ($Nm=9,8$). A AMOVA detectou 83,7% do total da variação dentro das progênies, 15% entre as progênies dentro das populações e somente 1,2% entre as populações e o mercado, confirmando uma estrutura genética mínima e sugerindo que as populações e o mercado são altamente relacionados. No entanto, existe alta variação intra-populacional que poderá ser utilizada pelos programas de melhoramento, permitindo seleção e cruzamentos entre matrizes dentro e entre as populações.

Palavras-chave: *Bactris gasipaes*, variação genética inter e intra-populacional, endogamia, fluxo gênico

GENETIC DIVERSITY AND STRUCTURE OF SELECTED PROGENIES OF THE PAMPA HERMOSA LANDRACE OF SPINELESS PEACH PALM (YURIMAGUAS, PERU) USING MICROSATELLITE MARKERS

ABSTRACT

The peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) is a domesticated palm that is widely distributed in the humid Neotropics. The populations of the Pampa Hermosa landrace (Yurimaguas, Peru) supply the majority of the seeds used in the expansion of the cultivated heart-of-palm agribusiness and in improvement programs in Brazil, because they are generally spineless and more productive than other landraces. Eight microsatellite loci were used to evaluate the diversity and genetic structure of selected progenies of three populations of the Pampa Hermosa landrace (Cuiparillo River [12 progenies; n=140]; Paranapura River [12 progenies; n=130]; Shanusi River [9 progenies; n=130]) and samples from the market of Yurimaguas (17 progenies; n=168) maintained in a progeny trial. A total of 121 alleles were detected, with a mean of 15.1 alleles per locus. The estimate of total diversity (H_T) was 0.82, similar to observations in other species of cultivated palms, such as coconut (*Cocos nucifera* L.) and oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). The observed heterozygosity (H_o) was inferior to the expected heterozygosity (H_e) in all loci; in the Bg02-08 locus, H_o was very inferior, suggesting a strong excess of homozygotes. H_o was lowest in Shanusi (0.64) and highest in Paranapura (0.74). The inbreeding coefficient (f) varied among populations and the market, being highest in Shanusi (0.190) and lowest in Paranapura (0.111); this inbreeding may be attributed to the agricultural practice of planting groups of half-sibs in swidden-fallow systems. Genetic divergence among the populations and the market was low ($\theta=0.025$; $G_{ST}=0.019$; $R_{ST}=0.018$), certainly due to high gene flow ($Nm = 9.8$). The AMOVA detected 83.7% of the total variation within the progenies, 15% among the progenies within populations, and only 1.2% among the populations and the market, confirming a weak genetic structure and suggesting that the populations and the market are closely related, as expected in a landrace. However, high intra-population variation exists that could be used by the improvement programs, permitting selection and the combination of specific plants, progenies and populations.

Key-words: *Bactris gasipaes*, inter and intra-population genetic variation, inbreeding, gene flow.

3.1 INTRODUÇÃO

A pupunheira cultivada (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes*) é uma palmeira domesticada com ampla distribuição nos trópicos úmidos americanos. Os processos de domesticação e distribuição contribuíram para a criação de um complexo de raças primitivas, que possuem características morfológicas, químicas e produtivas próprias (MORA URPI *et al.*, 1997). Clement & Mora Urpí (1987) observaram que diferentes raças poderiam servir como bases genéticas para diferentes objetivos dentro de programas de melhoramento genético.

A importância econômica desta palmeira inclui seu palmito e seu fruto para consumo humano (MORA URPI *et al.*, 1997). Hoje, o agronegócio do palmito de pupunheira encontra-se em franca expansão no Brasil, com perspectivas para a ampliação de seu consumo interno e para sua exportação (YUYAMA *et al.*, 2005). A base genética para o agronegócio na América Latina vem de populações de três raças primitivas de pupunheira inerme: Pampa Hermosa, Putumayo e Guatuso. As da raça Pampa Hermosa, encontradas ao redor de Yurimáguas, Loreto, Peru, fornecem a maioria absoluta das sementes usadas na expansão do agronegócio de palmito no Brasil (BOVI, 1997), devido a serem quase inermes (CLEMENT *et al.*, 1988) e mais produtivas que outras populações (MORA URPI *et al.*, 1999). Por sua vez, as populações da raça Putumayo são oriundas do oeste da Amazônia, enquanto que as da raça Guatuso são encontradas ao redor de San Carlos, Alajuela, Costa Rica (CLEMENT, 1997). A raça Pampa Hermosa forma a base dos programas de melhoramento da maioria das instituições Latino-Americanas, enquanto que a raça Putumayo é parte do programa da Embrapa, no Brasil, e a raça Guatuso é parte do programa em Costa Rica.

O Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) mantém um ensaio de progênes coletadas em 1991 ao longo dos rios Cuiparillo, Paranapura e Shanusi, e no mercado da cidade de Yurimáguas, Peru (CLEMENT *et al.*, 2001). Avaliações morfométricas

dos componentes de produção de palmito neste ensaio demonstraram tendências de diferenças entre as populações, com maior vigor das plantas coletadas ao longo do Rio Shanusi. Estas, quando comparadas as das outras três populações, apresentaram maior número de folhas verdes e comprimento da ráquis da terceira folha, bem como maior precocidade e diâmetro do estipe por ocasião da extração do palmito. O comprimento da haste, de onde se extrai o palmito, foi maior na população do Rio Parapapura e menor na do mercado. A população do Rio Cuiparillo apresentou valores intermediários para todos os caracteres avaliados (YUYAMA *et al.*, 2002). Apesar de existirem tendências para diferenças morfométricas e produtivas entre estas populações, seu uso será difícil porque as herdabilidades destes componentes de produção são baixas (CLEMENT, 1995; FARIAS NETO & RESENDE, 2001).

As populações da raça primitiva Pampa Hermosa têm sido objeto de análise genética por diversos autores devido a sua importância para o agronegócio. Análises isoenzimáticas (nove enzimas com 16 *loci* e 38 alelos) detectaram mais variabilidade na raça Pampa Hermosa (heterozigosidade observada de 0,14 e 69% dos *loci* polimórficos) que nas raças Putumayo (0,07 e 56%) e Guatuso (0,05 e 44%) (CLEMENT *et al.*, 1997). A primeira análise direta do DNA realizada na raça Pampa Hermosa, com 97 marcadores RAPDs, detectou uma heterozigosidade observada (H_o) de 0,26 e 75% de polimorfismo, enquanto que a raça Putumayo apresentou 0,27 e 77%, e a raça Guatuso apresentou 0,23 e 67%, respectivamente (Rodrigues *et al.*, 2004a). A análise também mostrou que a raça Pampa Hermosa é claramente diferente da raça Putumayo, geograficamente mais próxima, embora exista alto fluxo gênico entre essas raças ($Nm=11$). É possível que a maior variabilidade genética em Pampa Hermosa contribui para sua maior produtividade, considerada a melhor das raças primitivas testadas na Costa Rica (MORA URPI *et al.*, 1999).

Marcadores RAPDs também foram utilizados para verificar se existiam outras raças, além da Pampa Hermosa, na região próxima de Yurimáguas, como sugerido por Mora Urpí & Clement (1988) numa tentativa de explicar a alta variabilidade genética observada. O estudo comparou as populações existentes ao longo dos rios Huallaga, Cuiparillo, Paranapura e Shanusi (base da proposta original da raça Pampa Hermosa) por meio da análise de acessos mantidos no Banco de Germoplasma de Pupunha do INPA. Os 73 marcadores detectaram uma H_o de 0,33 e 90% de **loci** polimórficos, mas não foi possível detectar estrutura populacional que refletisse o sistema fluvial, sugerindo que as populações são muito relacionadas. As distâncias de Nei (1978) evidenciam muita similaridade (todas menores que 0,027), sugerindo a existência de uma só raça na região de Yurimáguas (SILVA, 2004).

Adin **et al.** (2004) usaram marcadores AFLPs para analisar o fluxo gênico entre as populações de pupunheiras existentes nas comunidades indígenas e tradicionais ao longo dos rios Cuiparillo e Paranapura, e determinaram que o fluxo é tão alto que a diferenciação populacional quase não ocorre, o que apóia a sugestão de Silva (2004) de que a região de Yurimáguas contém somente a raça Pampa Hermosa. Os 133 **loci** polimórficos detectaram heterozigosidades e polimorfismo ligeiramente maiores nas populações ao longo do rio Paranapura (0,25 e 65,5%) que nas do rio Cuiparillo (0,24 e 61,6%), possivelmente devido ao grande número de plantas amostrado nas comunidades indígenas ao longo do rio Paranapura (ADIN **et al.**, 2004).

Clement & Bovi (1999) e Yuyama **et al.** (2002) discutiram o estado dos programas de melhoramento de pupunheira no Brasil e identificaram os componentes de produção que precisam ser modificados pelos programas: plantas inermes, perfilhamento, rápido crescimento, comprimento do palmito > 45 cm. Considerando que a maioria destes componentes de produção de palmito possui herdabilidades baixas (CLEMENT, 1995; FARIAS NETO & RESENDE, 2001), a seleção assistida por marcadores moleculares

(STUBER, 1992) poderá ser uma ferramenta poderosa para garantir os ganhos genéticos que serão necessários para justificar os programas de melhoramento genético de pupunheira no Brasil (CLEMENT, 2001). Para esta finalidade, marcadores microssatélites serão mais eficientes que as isoenzimas, os RAPDs e os AFLPs usados até agora, pois são multi-alélicos e tem expressão co-dominante (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998), todas características que facilitam a análise genética. Atualmente, existem cerca de 40 **loci** microssatélites para pupunheira (MARTÍNEZ *et al.*, 2002; BILLOTTE *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2004b), os quais estão sendo usados em estudos de diversidade e estrutura genética de populações cultivadas e silvestres dessa palmeira (COUVREUR *et al.*, 2006; HERNANDEZ, 2005; COLE *et al.*, 2007). Estes marcadores possibilitarão discriminar com maior precisão entre as populações, podendo orientar a seleção de matrizes e a busca de vigor híbrido, via maximização de heterozigosidade dentro da raça Pampa Hermosa.

Este trabalho tem como objetivo avaliar a diversidade e a estrutura genética de progênies elites de pupunheira inerme de três populações da raça primitiva Pampa Hermosa e uma amostragem do mercado da cidade de Yurimáguas, usando marcadores microssatélites, para apoiar os programas de melhoramento que utilizam estes recursos genéticos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal e extração de DNA

Amostras de progênies elites de três populações da raça primitiva Pampa Hermosa e do mercado da cidade de Yurimáguas foram coletadas no ensaio de progênies do INPA (Estação Experimental de Fruticultura Tropical, BR 174, km 38, Manaus, AM, Brasil), sendo 12 progênies do rio Cuiparillo (n=140), 12 do rio Paranapura (n=130), nove do rio Shanusi (n=130) e 17 progênies do mercado de Yurimáguas (n=168) (Anexo 1). A maioria das progênies é representada por 60 plantas no campo, e todas já foram avaliadas em termos de

espinhos e componentes de produtividade de palmito (plantas inermes, perfilhamento, rápido crescimento, comprimento do palmito > 45 cm). A amostragem concentrou-se em plantas e acessos selecionados para comprimento do palmito (122 plantas), sendo 79 plantas com palmito > 45 cm, 23 plantas > 54 cm e 20 plantas > 60 cm; 446 plantas não selecionadas (< 45 cm) também foram analisadas para melhor entender a diversidade genética da raça Pampa Hermosa, variando de 6 a 30 plantas por progênie. Para permitir a comparação entre as populações e o mercado, utilizou-se seis a sete plantas em cada progênie, sempre incluindo as plantas selecionadas e completando sete plantas ao acaso. Para a análise de estrutura genética (estatísticas F) e AMOVA, excluiu-se as progênies com menos de seis plantas, evitando-se erros amostrais nas análises de variância.

O DNA foi extraído com o reagente DNAzol (Life Technologies), utilizando-se 100 mg de meristema apical de um estipe lateral, com praticado por Clement *et al.* (1997). Após a extração, o DNA foi quantificado em gel de agarose 0,9% corado com Brometo de Etídio.

3.2.2 Amplificação dos *loci* microssatélites

Oito dos dez pares de ‘primers’ microssatélites desenvolvidos por Rodrigues *et al.* (2004b) foram selecionados para a genotipagem das plantas. Adicionou-se a extremidade 5’ do ‘primer forward’ de cada *locus* a sequência M13 (5’ TGTAACGACGGCCAGT 3’), e uma outra sequência M13 foi marcada com fluorocromo específico (6-FAM, HEX e TAMRA), segundo o protocolo de Schuelke (2000) com algumas modificações. A reação de PCR foi conduzida utilizando-se um volume total de 10 µl, contendo 1 µl de tampão 10X (TrisHCl 100 mM, KCl 500 mM, pH 8.4), 1 µl dNTP (2,5 µM), 1 µl de MgCl₂ (25 mM), 0,25 µl Primer Forward M13 (5 µM), 0,25 µl Primer Forward M13 marcado com FAM, Hex ou TAMRA (5 µM), 0,5 µl Primer Reverse (5 µM), 1,5 U Easy Taq DNA Polymerase (Lambda Gene), e 15 ng de DNA genômico. As amplificações foram realizadas em termociclador MJ

Research PTC-100 seguindo o programa: 94°C por 2 min; 25 ciclos de 94°C por 10 seg, a temperatura de anelamento do primer (T_a), segundo Rodrigues *et al.* (2004b) por 20 seg, 72°C por 30 seg; um ciclo de 72°C por 10 min, 20 ciclos de 94°C por 10 seg, 50°C por 20 seg, 72°C por 30 seg, e uma extensão a 72°C por 30 min. Os produtos de PCR gerados foram visualizados em seqüenciador automático (Mega Bace 1000). A estimativa do tamanho dos alelos (pb - pares de bases) foi realizada com os programas Fragment Profiler (GE Healthcare, England), auxiliado pelo marcador de peso molecular (Size Standard) ET-400-ROX (GE Healthcare, England).

3.2.3 Análise genética dos dados

Calcularam-se as frequências alélicas para cada **lócus** com auxílio do programa CONVERT (GLAUBITZ, 2004). O número de alelos (**A**), a heterozigosidade observada (**H_o**) e esperada (**H_e**), e o coeficiente de endogamia (**f**) foram calculados para cada **lócus** e população com o programa FSTAT v.2.9.3.2 (GOUDET, 2002). O número de alelos privados (**P** – definido como um alelo encontrado em uma única população) foi calculado usando o programa CONVERT (GLAUBITZ, 2004). Os alelos foram classificados como comum (frequência > 0,2), intermediário (> 0,05) ou raro (< 0,05), bem como privado (presente em apenas uma população), esporádico (presente em duas populações) ou difundido (presente em três ou quatro populações), similar ao esquema de Marshall & Brown (1975).

O programa Genepop v.3.1d (RAYMOND & ROUSSET, 1995) foi utilizado para testar o desequilíbrio de ligação entre pares de **loci** (Opção 2, sub-opção 1 com 1000 desmemorizações, 10 lotes de dados e 1000 iterações por lote) e o teste exato para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (Opção1, sub-opção 3 com 5000 desmemorizações, 500 lotes de dados e 5000 iterações por lote) para as amostras populacionais. Os níveis de

significância foram ajustados usando o método de Bonferroni, para examinar os testes múltiplos na série de dados (RICE, 1989).

A estrutura genética molecular entre as populações foi investigada por meio da análise da diversidade em populações subdivididas de Nei (NEI, 1987), sob modelo fixo para efeito de população, visto que as populações amostradas, por serem duplamente selecionadas (durante a coleta e no ensaio de progênies), não se enquadram no modelo aleatório. A estimação dos parâmetros genéticos H_T e G_{ST} , e os análogos das estatísticas F (WRIGHT, 1951), θ (similar a F_{ST}) estimativa de divergência entre populações, f (similar a F_{IS}) e F (similar a F_{IT}) estimativa de excesso de heterozigotos (< 0) e deficiência (> 0) dentro de cada população e no conjunto de populações, respectivamente (WEIR & COCKERMAN, 1984), foram calculados com os programas FSTAT v.2.9.3.2 (GOUDET, 2002) e GENETIX v.4.05.2 (BELKHIR *et al.*, 2004). A significância estatística de f e θ foi testada por ‘bootstrap’ para todos os *loci*, com intervalo de confiança de 95%. Em adição à θ e G_{ST} , a estatística R_{ST} foi estimada por assumir o modelo ‘stepwise’ (SLATKIN, 1995), usando o programa R_{ST} CALC v.2.2 (GOODMAN, 1997), após padronização dos tamanhos dos alelos pelo programa R_{ST} Standardize v. 2.2 (GOODMAN, 1997), e testou-se sua significância via teste de permutação (10.000) e ‘bootstrap’ para todos os *loci*, com intervalo de confiança de 95%.

Para determinar a estrutura genética entre e dentro das populações, mercado e progênies, uma análise hierárquica da variância molecular (AMOVA, MICHALAKIS & EXCOFFIER, 1996) foi efetuada, usando o programa Arlequin v.3.01 (EXCOFFIER *et al.*, 2005). O grau de diferenciação das populações e mercado foi quantificado pela estimativa de F_{ST} entre os pares com auxílio do Programa Arlequin v.3.01.

O fluxo gênico médio foi estimado assumindo que $Nm=(1/F_{ST}-1)/4$ (WHITLOCK & MCCAULEY, 1999) e o número absoluto de migrantes ($M=2Nm$) entre populações e

mercado também foi estimado com base em F_{ST} , usando o programa Arlequin v.3.01 (EXCOFFIER *et al.*, 2005).

Para demonstrar que a amostragem de plantas não estava tendo impacto sobre as estimativas de parâmetros genéticos, foi efetuada uma comparação entre as heterozigosidades (H_o e H_e), o coeficiente de endogamia (f) e o número de plantas por progênie (N), a partir de gráfico plotado em Excel v.11.1, com análise de Regressão linear (R^2) entre a estimativa e o número de plantas.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Diversidade alélica dos *loci* microssatélites

Os oito *loci* microssatélites detectaram 121 alelos nas três populações e no mercado, com uma média de 15,1 alelos por *locus*, confirmando o alto conteúdo de informação genética desse tipo de marcador para estudos genéticos com a pupunheira (MARTÍNEZ *et al.*, 2002; BILLOTTE *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2004b). O número de alelos por *locus* variou de 10 (Bg02-10) a 22 (Bg02-19). A distribuição das frequências alélicas variou entre os *loci* e as populações e o mercado (Figura 1).

Os alelos foram classificados de acordo com suas frequências e distribuição entre as populações (Tabela 1). Os alelos comuns e intermediários superaram as expectativas de Marshall & Brown (1975), certamente porque os microssatélites têm alta taxa de mutação (SLATKIN, 1995). Os *loci* Bg02-08 e Bg02-10 apresentaram dois alelos com frequências entre 0,3 e 0,4 nas três populações e no mercado (Figura 1). Um total de 83 alelos foi categorizado como raros, a maioria compartilhada pelas três populações e o mercado, e apenas 14 sendo privativos a populações específicas. Cole *et al.* (2007) encontraram seis alelos raros privativos em quatro populações de pupunheira cultivada por comunidades indígenas e de camponeses na região de Iquitos (Peru), mesmo usando apenas três *loci* microssatélites, o que sugere que alelos privados são frequentes, como esperado pelas taxas de mutação.

Tabela 1 - Classificação do número de alelos de acordo com sua frequência e distribuição entre amostras de pupunheira (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes*) inerte de três populações e do mercado (Yurimáguas, Peru), considerando oito *loci* microssatélites.

	Comum (> 0,2)	Intermediário (> 0,05)	Raro (< 0,05)	Total
Privados	0	0	14	14
Esporádico	0	0	10	10
Difundido	12	26	59	97
Total	12	26	83	121

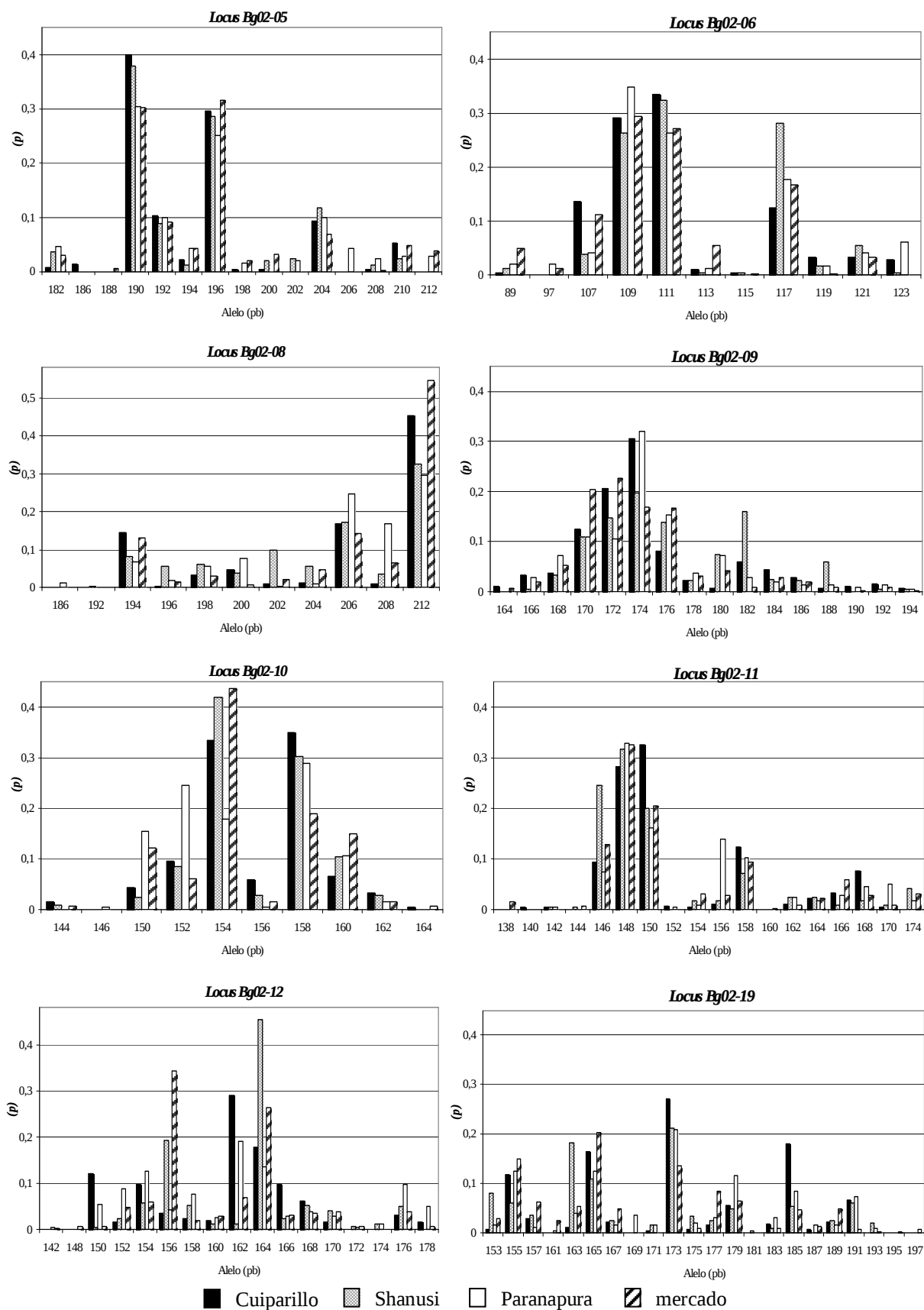


Figura 1 - Histogramas de distribuição das frequências alélicas de oito *loci* microsatélites em amostras de pupunheira (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes*) de três populações e do mercado (Yurimáguas, Peru)

Na comparação entre as estimativas de heterozigosidade observada (H_o), esperada (H_e) e coeficiente de endogamia (f) versus o número de plantas por progênie (Figura 2), observa-se que a amostragem não teve impacto sobre as estimativas. Isto não era esperado, especialmente quando o número de plantas foi pequeno, e sugere que as estimativas não estão sendo infladas pelo número de plantas por progênie.

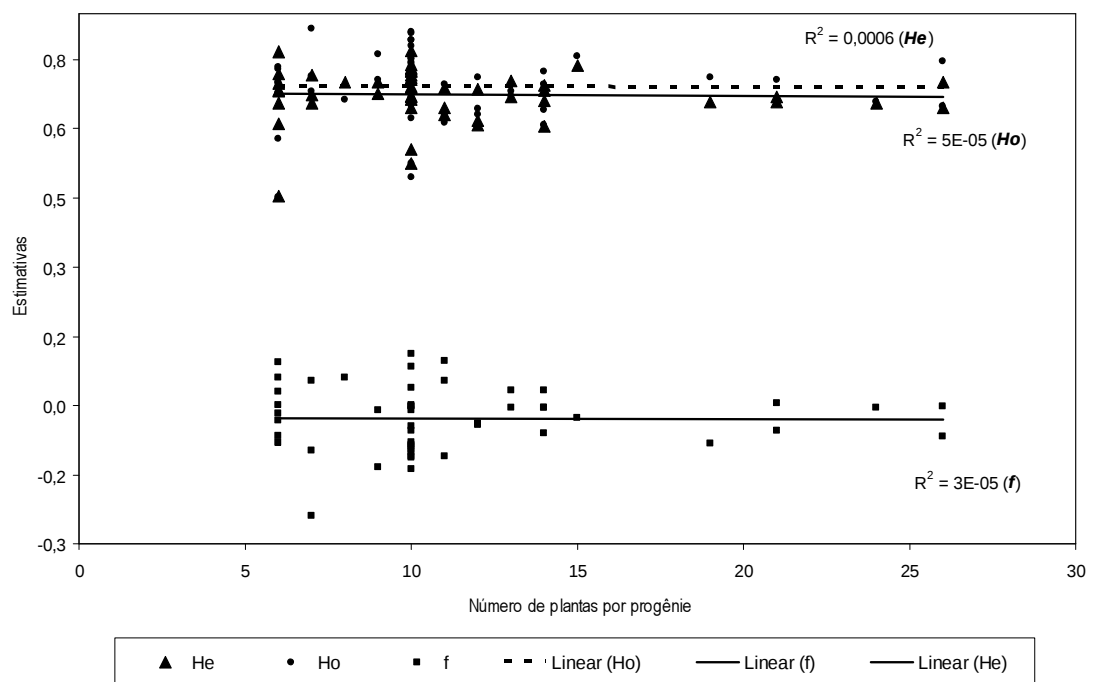


Figura 2 - Estimativas dos parâmetros genéticos, baseado em oito **loci** microsatélites **versus** número de plantas por progênie analisadas de pupunheira (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes*) de três populações e do mercado (Yurimáguas, Peru).

As estimativas de diversidade total (H_T) foram altas para todos os **loci** estudados (Tabela 2), sendo similares às encontradas por Hernandez (2005) e Cole *et al.* (2007) com três **loci** microsatélites, e por Couvreur *et al.* (2006) com oito **loci** para populações de pupunheira cultivadas e silvestres. Foram similares também às estimativas reportadas para outras palmeiras cultivadas, como *Cocos nucifera* (oito **loci** SSR; PERERA *et al.*, 2000), *Elaeis guineensis* e *E. oleifera* (21 **loci** SSR; BILLOTTE *et al.*, 2001).

Tabela 2 - Índices de diversidade genética, coeficiente de endogamia e diferenciação genética de oito **loci** microssatélites para amostras de pupunheira (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes*) inerme de três populações e do mercado (Yurimáguas, Peru), e ainda do conjunto, considerado aqui como a raça Pampa Hermosa. **A** – Número de alelos; **P** – Número de Alelos Privados; **H_o** – Heterozigosidade observada; **H_e** – Heterozigosidade esperada; **H_T** – Diversidade gênica total; **f** – coeficiente de endogamia de Weir & Cockerham (1984); **G_{ST}** – Estimador de diferenciação genética de Nei. Equilíbrio de Hardy Weinberg – **He*** não significativo a **p** > 0,05; endogamia – **f*** não diferente de zero a **p** > 0,005.

População		Bg02-05	Bg02-06	Bg02-08	Bg02-09	Bg02-10	Bg02-11	Bg02-12	Bg02-19	Todos os loci
Cuiparillo (N=140)	A	11	10	10	16	9	14	13	16	99
	P	1	-	-	-	-	1	-	-	2
	H_o	0,69	0,67	0,31	0,74	0,82	0,71	0,72	0,81	0,68
	H_e	0,73*	0,77*	0,73	0,83	0,74	0,78*	0,84	0,84*	0,78
	f	0,063*	0,131	0,580	0,120	-0,104*	0,096	0,148	0,043*	0,132
Shanusi (N=130)	A	10	10	11	14	8	14	14	17	98
	P	-	-	1	-	-	-	-	1	2
	H_o	0,77	0,61	0,44	0,74	0,71	0,53	0,64	0,71	0,64
	H_e	0,82*	0,77*	0,81	0,84	0,79*	0,83	0,90*	0,89	0,79
	f	-0,029*	0,183	0,468*	0,155	0,008	0,339	0,141	0,205	0,190
Paranapura (N=130)	A	12	10	11	15	8	14	16	19	105
	P	1	-	1	-	1	-	-	1	4
	H_o	0,77	0,75	0,48	0,73	0,78	0,76	0,83	0,81	0,74
	H_e	0,75	0,74*	0,83	0,87	0,71*	0,79*	0,74	0,89	0,83
	f	0,059*	0,036*	0,405	0,128	0,017*	0,08	0,076	0,091	0,111
mercado Yurimáguas (N=168)	A	12	10	10	16	9	15	16	19	107
	P	1	-	-	-	-	2	1	2	6
	H_o	0,78	0,76	0,31	0,82	0,71	0,69	0,74	0,76	0,69
	H_e	0,79	0,79	0,66	0,84	0,73	0,82	0,80	0,89	0,79
	f	0,017*	0,05*	0,532	0,033*	0,038*	0,165	0,078	0,146	0,124
Pampa Hermosa (N=568)	A	15	11	12	16	10	18	17	22	121
	P	3	-	2	-	1	3	1	4	14
	H_o	0,75	0,70	0,39	0,76	0,76	0,67	0,73	0,77	0,69
	H_e	0,77	0,77	0,76	0,85	0,77	0,82	0,87	0,89	0,81
	H_T	0,78	0,78	0,78	0,86	0,77	0,82	0,87	0,90	0,82
	f	0,031*	0,104	0,508	0,117	0,019*	0,176	0,156	0,135	0,155
	G_{ST}	0,003	0,008	0,023	0,014	0,028	0,013	0,054	0,015	0,02

As estimativas das heterozigosidades observadas (H_o) e esperadas (H_e) na maioria dos **loci** foram altas, com valores menores para os **loci** Bg02-08 e Bg02-11. Os valores de H_o apresentaram-se inferiores ao H_e na maioria dos **loci**, com exceção do **locus** Bg02-10 na população de Cuiparillo e quatro **loci** em Paranapura (Tabela 2). Diferenças claras entre H_o e H_e nos **loci** Bg02-08 e Bg02-11 (Tabela 2) indicam deficiência de heterozigotos, também observado por Couvreur *et al.* (2006) e Cole *et al.* (2007). Considerando que poucos indivíduos falharam na amplificação individual dos **loci**, alelos nulos são improváveis para explicar a deficiência de heterozigotos (SELKOE & TOONEN, 2006).

O teste exato de Fischer revelou que 50% dos **loci** não aderem ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) no conjunto de populações. Zehdi *et al.* (2004) demonstraram, usando 14 **loci** microssatélites, deficiência significativa de heterozigotos para dois grupos de populações de tâmara (*Phoenix dactylifera* L.) na Tunísia e nenhum desvio ao EHW em outros dois grupos, e sugerem que isto poderá ser explicado pela forte seleção operada nestes dois grupos em relação aos outros.

Em nosso estudo é possível que esta não aderência seja devido à amostragem ser viciada pela seleção também, primeiro, pela seleção de plantas inermes durante a prospecção para criar o ensaio de progênies e, segundo, pela seleção no ensaio para amostrar plantas com maior comprimento do palmito, ambas, seleções eliminando a casualidade da amostragem, um dos pressupostos do modelo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HARTL, 2000). Os testes de desequilíbrio de ligação não foram significativos para os pares de **loci** em cada população, revelando 78% de independência dos **loci** em Shanusi, seguido de 75% e 68% em Paranapura e Cuiparillo, respectivamente ($p > 0,05\%$, após correção de Bonferroni). Isto sugere que a maioria dos **loci** está amostrada em regiões independentes no genoma, como observado por Couvreur *et al.* (2006) para os oito **loci** de Billotte *et al.* (2004) usados para analisar populações cultivadas e silvestres de pupunheira no Equador.

Os valores dos estimadores de endogamia de Weir e Cockerman (1984) variaram para os oito **loci** e foram significativamente diferentes de zero ($p < 0,05$) na maioria deles. O **locus** Bg02-08 apresentou os maiores índices de fixação nas três populações e no mercado, o que concorda com a deficiência de heterozigotos observada. Esta endogamia no conjunto de plantas é explicada em parte pela significativa endogamia biparental detectada na análise do sistema de cruzamento para as três populações aqui analisadas (veja capítulo 5) e também é esperada em populações pequenas sob influência de seleção humana, dado a abundância de parentes numa área pequena e ainda pela prática agrícola de plantar meios irmãos nas roças (CLEMENT, 1988; HANCOCK, 2004).

3.3.2 Diversidade genética entre e dentro de populações

O número de alelos para todos os **loci** foi maior no mercado e em Paranapura, e menor em Shanusi e Cuiparillo, mas sempre muito similar (Tabela 2). Os altos índices de diversidade estimados pelas heterozigosidades observadas e esperadas foram similares nas três populações, sendo um pouco menor em Shanusi e Cuiparillo e maior em Paranapura. Resultados semelhantes foram observados por Adin **et al.** (2004) com AFLPs em Cuiparillo e Paranapura. Estas altas heterozigosidades indicam alta variabilidade nas populações, como observado por Rodrigues **et al.** (2004a) e Silva (2004) com RAPDs para a raça Pampa Hermosa como uma unidade, e por Adin **et al.** (2004) para as populações ao longo dos rios Cuiparillo e Paranapura. Isto sugere que as populações da região de Yurimáguas mantêm uma base genética ampla, apesar da seleção praticada pelos agricultores, e que o ensaio de progênes também mantém, apesar da seleção praticada pelos pesquisadores durante as prospecções. Os altos índices de diversidade nas populações foram similares aos detectados para outras palmeiras cultivadas, como coco (PERERA **et al.**, 2001; MEEROW **et al.**, 2003), tâmara (ZEHDI **et al.**, 2004) e dendê (BILLOTTE **et al.**, 2001).

Os coeficientes de endogamia (f) para todas as populações foram significativamente diferentes de zero ($p < 0,05$), sendo maior em Shanusi e menor em Paranapura (Tabela 2). Coeficientes de endogamia similares foram detectados por Clement *et al.* (1997) com 16 *loci* isoenzimáticos e por Cole *et al.* (2007) com três *loci* microssatélites. De acordo com Cole *et al.* (2007), os níveis significativos de endogamia em populações de comunidades de camponeses e indígenas são resultados de cruzamentos entre meios-irmãos durante muitas gerações (como sugerido por Clement, 1988). Portanto, a prática agrícola de plantar vários meios-irmãos nas roças poderá estar contribuindo para níveis significativos de endogamia nas populações, como sugerido por Rodrigues (veja capítulo 5) para as três populações aqui estudadas.

A análise da variância molecular estimou a partição da diversidade genética total de forma hierarquizada: entre as populações (rios) e o mercado; entre as progênies dentro dos rios e o mercado; e dentro das progênies. A análise detectou que 83,7% do total da variação genética foi encontrada dentro das progênies, 15% entre as progênies dentro das populações, e somente 1,2% entre as populações, com valores significativos ($p < 0,001$). A proporção entre as populações é similar para as estimativas de G_{ST} (0,019), θ (0,025) e R_{ST} (0,018), confirmando a estrutura genética mínima entre as populações e o mercado, assim como observado por Silva (2004) com marcadores RAPDs e por Adin *et al.* (2004) com marcadores AFLPs entre populações da raça Pampa Hermosa. Resultados similares foram observados por Perera *et al.* (2001) para populações de coco do Sri Lanka, o qual demonstrou 98,5% de variação dentro das populações.

A diferenciação genética (F_{ST}) entre os pares de populações e mercado foi baixa, mas significativamente diferente de zero ($p < 0,05$) (Tabela 3). A diferenciação genética entre os rios foi menor entre Paranapura e Cuiparillo, similar às observações de Adin *et al.* (2004) que detectaram diferenciação significativa ($G_{ST} = 0,0249$), mas não foi observada nenhuma

relação entre diferenciação genética e isolamento por distância das populações devido ao alto fluxo gênico. Considerando que a troca de material genético entre os rios poderia contribuir para uma fraca diferenciação genética, como sugerido por Adin *et al.* (2004), a maior diferenciação aqui observada entre Shanusi e Paranapura provavelmente reflete baixa troca de sementes pelas comunidades destes dois rios. Observou-se menor diferenciação entre as progênes do mercado e de Shanusi, provavelmente pelo fato deste rio desembocar próximo à cidade de Yurimáguas e ser geograficamente mais próximo, o que aumenta a probabilidade de que à maioria do material genético (cachos) comercializado no mercado seja proveniente do rio Shanusi (veja capítulo 4).

As baixas estimativas de diferenciação genética entre as populações são consistentes com as altas taxas de fluxo gênico ($Nm = 9,8$ migrantes por geração, baseado na estimativa de F_{ST}). O fluxo gênico entre os rios foi menor com Shanusi, e maior entre Paranapura e Cuiparillo, como observado por Adin *et al.* (2004). Entre as progênes do mercado e os rios observou-se um fluxo maior com Shanusi e menor com Cuiparillo, refletindo a baixa estimativa de F_{ST} (Tabela 3), e demonstra que provavelmente no mercado a maioria do material comercializado é proveniente de Shanusi e menos dos outros dois rios.

Tabela 3 - Matriz de divergência (F_{ST} – diagonal abaixo) e fluxo gênico [M (número absoluto de migrantes) = $2Nm$ – diagonal acima] entre amostras de pupunheira (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes*) inerte de três populações e do mercado (Yurimáguas, Peru), considerando oito *loci* microssatélites; valores de F_{ST} $p < 0,05$.

	Cuiparillo	Shanusi	Paranapura	mercado
Cuiparillo	-	13,5	36,9	16,6
Shanusi	0,035	-	15,4	34,3
Paranapura	0,013	0,034	-	18,5
mercado	0,029	0,014	0,026	-

3.4 CONCLUSÃO

Os oito **loci** microssatélites utilizados neste estudo foram extremamente informativos, com altas heterozigosidades e número médio de alelos. Os índices de diversidade genética foram altos para todas as populações e o mercado. Curiosamente as progênes do rio Shanusi apresentaram a menor diversidade, mesmo sendo consideradas boas produtoras de palmito, e as progênes do rio Paranapura apresentaram maior diversidade. A análise da estrutura genética populacional demonstra uma pequena, mas significativa, diferenciação entre as populações, certamente reduzida pelo alto fluxo gênico. Esta estrutura pode ser utilizada no programa de melhoramento, pois duas populações mostram características morfométricas e genéticas diferentes, o que permitiria a criação de populações divergentes para iniciar um programa de melhoramento via seleção recíproca e recorrente. Em geral, existe alta variabilidade intrapopulacional nas progênes da raça Pampa Hermosa no ensaio, que pode ser usada nos programas de melhoramento. A questão agora é como orientar a seleção e o cruzamento de matrizes divergentes para maximizar a diversidade entre elas, reduzir os efeitos de endogamia e, possivelmente, obter vigor híbrido.

4 RELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE PROGÊNIES SELECIONADAS DE PUPUNHEIRA INERME DA RAÇA PRIMITIVA PAMPA HERMOSA UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES: IMPLICAÇÕES PARA O MELHORAMENTO

RESUMO

Entre as palmeiras produtoras de palmito destaca-se a pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth). A base genética para o agronegócio no Brasil vem de populações da raça Pampa Hermosa, as quais fornecem a maioria absoluta das sementes devido a serem quase inermes e mais produtivas que outras populações. Este trabalho avaliou as relações genéticas entre 46 progênies selecionadas de pupunheira (usando 6 a 7 plantas/progênie) de três populações da raça Pampa Hermosa e do mercado de Yurimáguas, usando oito **loci** microsatélites, para facilitar o planejamento do programa de melhoramento para palmito baseado na escolha de progênies divergentes para cruzamentos controlados. As heterozigosidades observadas (H_o) e esperadas (H_e) foram altas para a maioria das progênies, variando de 0,48 a 0,82 e de 0,48 a 0,79, respectivamente, evidenciando alta variabilidade genética dentro das progênies. O coeficiente de endogamia (f) para o conjunto de progênies não foi diferente de zero, evidenciando quase panmixia na polinização das progênies e confirmando a alta variabilidade observada pelas estimativas de heterozigosidade. O dendrograma de distâncias genéticas de alelos compartilhados (D_{AS}) das populações mostra maior proximidade entre as populações de Paranapura e Cuiparillo, e entre o mercado e Shanusi. No entanto, o dendrograma das progênies mostra alta afinidade genética e formação de grupos independentes de sua área geográfica de origem, sugerindo a quase ausência de estrutura populacional dentro da raça. Dois planos de melhoramento são factíveis com essa informação: melhoramento populacional, com cruzamentos entre plantas e progênies altamente divergentes; e melhoramento via seleção recorrente recíproca, com a criação de populações divergentes em termos morfométricos e genéticos.

Palavras-chave: ensaio de progênies, distância genética, heterozigosidade, divergência

GENETIC RELATIONSHIPS AMONG SELECTED SPINELESS PROGENIES OF THE PAMPA HERMOSA LANDRACE OF PEACH PALM USING MICROSATELLITE MARKERS: IMPLICATIONS FOR IMPROVEMENT

ABSTRACT

Peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) is currently the most important source of cultivated heart-of-palm. The genetic base for this agribusiness in Brazil comes from populations of the Pampa Hermosa landrace (Yurimaguas, Peru), which supplies the majority of seeds used due to their spinelessness and greater productivity when compared to other populations. This study evaluated the genetic relations among 46 selected progenies (using 6 or 7 plants/progeny) of three populations of the Pampa Hermosa landrace and collections from the Market of Yurimaguas, using eight microsatellite loci, in order to facilitate the planning of the improvement program for heart-of-palm based on the choice of divergent progenies for controlled crosses. The observed (H_o) and the expected (H_e) heterozygosities were high for the majority of the progenies, varying from 0.48 to 0.82 and from 0.48 to 0.79, respectively, demonstrating high genetic variability within the progenies. The inbreeding coefficient f for the set of progenies was not different from zero, suggesting panmixia during pollination of the progenies and confirming the high variability observed for the estimates of heterozygosity. The dendrogram of genetic distances of shared alleles (D_{AS}) of the populations showed greater proximity between the populations of Paranapura and Cuiparillo, and between the Market and Shanusi. However, the dendrogram of the progenies showed high genetic affinities and the formation of groups independent of their geographic origin, suggesting the absence of population structure within the landrace. This information will be used to guide the selection and combination of progenies and populations. Two improvement plans are feasible with this information: population improvement, with crosses among highly divergent plants and progenies; improvement by reciprocal recurrent selection, with the creation of divergent populations based on morphometric and genetic information.

Key-words: progeny trial, genetic distance, heterozygosity, divergence

4.1 INTRODUÇÃO

Entre as palmeiras produtoras de palmito destaca-se a pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes*), cujo mercado encontra-se em franca expansão no Brasil, com perspectivas para a ampliação de seu consumo interno e sua exportação (YUYAMA *et al.*, 2005). Para a agronegócio, a pupunheira possui grandes vantagens sobre outras espécies, como o açaí (*Euterpe oleracea*) e juçara (*Euterpe edulis*), principalmente no que se refere à precocidade, perfilhamento e rusticidade, embora apresente algumas particularidades que a torna bastante exigente em insumos e em propriedades físicas e químicas do solo (BOVI, 2000).

A base genética para o agronegócio na América Latina vem de populações de três raças primitivas de pupunheira inerme: as da raça Pampa Hermosa (ao redor de Yurimáguas, Peru) fornecem a maioria absoluta das sementes usadas na expansão do agronegócio de palmito no Brasil (BOVI, 1997), devido a serem quase inermes (CLEMENT *et al.*, 1988) e mais produtivas que outras populações (MORA URPI *et al.*, 1999); as da raça Putumayo (no oeste da Amazônia); e as da raça Guatuso (ao redor de San Carlos, Alajuela, Costa Rica) (CLEMENT, 1997). A raça Pampa Hermosa forma a base dos programas de melhoramento da maioria das instituições Latino-Americanas, enquanto que a raça Putumayo é parte do programa da Embrapa, no Brasil, e a raça Guatuso é parte do programa em Costa Rica.

O programa de melhoramento de pupunheira do INPA tem como objetivo obter progênies com rápido crescimento, mais de quatro perfilhos, alta frequência do comprimento do palmito > 45 cm e plantas inermes (YUYAMA *et al.*, 2002). Este ideótipo vem sendo usada para avaliar as 270 progênies das populações de pupunheira inerme da raça Pampa Hermosa, Yurimáguas, Peru, introduzidas em 1991. Estas progênies são oriundas das bacias de três rios, Cuiparillo, Shanusi, Paranapura, e do mercado da cidade de Yurimáguas.

Avaliações morfométricas dos componentes de produção de palmito neste ensaio demonstram tendências de diferenças entre as populações, com maior vigor das plantas do Rio Shanusi, devido ao maior número de folhas verdes e ao comprimento da ráquis da terceira folha, bem como maior precocidade e diâmetro do estipe por ocasião da extração do palmito. O comprimento da coluna da copa, de onde se extrai o palmito, é maior na população do Rio Paranapura e menor nas progênes do mercado. A população do Rio Cuiparillo sempre é intermédia (YUYAMA *et al.*, 2002). Com base nas avaliações morfométricas mencionadas, foram realizadas seleções entre progênes para precocidade, perfilhamento e comprimento do palmito, e dentro das progênes com base na repetibilidade do comprimento e peso de palmito (> 45 cm e > 200 g).

Provavelmente, a maior variabilidade genética em Pampa Hermosa contribui para sua maior produtividade, considerada a melhor das raças primitivas testadas (MORA URPI *et al.*, 1999). Apesar de existirem tendências para diferenças morfométricas e produtivas entre estas populações, seu uso será difícil porque as herdabilidades destes componentes de produção são baixas (CLEMENT, 1995; FARIAS NETO & RESENDE, 2001). Nesta situação, a seleção de genitores e a caracterização da variabilidade genética auxiliada por marcadores moleculares poderão ser decisivas para o incremento de eficiência nos programas de melhoramento genético da espécie no Brasil (CLEMENT, 2001).

Marcadores microsatélites serão ideais para este fim, pois exibem herança mendeliana, são multi-alélicos e têm expressão co-dominante (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998), todas características que facilitam a análise genética. Hoje, existem cerca de 40 *loci* microsatélites para pupunheira (BILLOTTE *et al.*, 2004; MARTÍNEZ *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2004b), os quais estão sendo usados em estudos de diversidade e estrutura genética de populações de pupunheira cultivadas e silvestres (COUVREUR *et al.*, 2006; COLE *et al.*, 2007; HERNANDEZ, 2005). Estes

marcadores possibilitarão discriminar com maior precisão entre acessos e populações, podendo orientar a seleção de matrizes e a busca de vigor híbrido a partir da maximização de heterozigosidade dentro da raça Pampa Hermosa.

Em programas de melhoramento de espécies alógamas, como a pupunheira, a busca de divergência genética dentro e entre populações, isto é a classificação de genitores em grupos heteróticos, poderia ser usada na realização de cruzamentos que irão ampliar a variabilidade genética nas populações segregantes (MESSMER *et al.*, 1993). O progresso genético nessas populações está diretamente ligado à manutenção da variação genética, uma vez que quanto menor a variabilidade, menor os ganhos genéticos com a seleção (FALCONER, 1987). Dentre os métodos de melhoramento que poderiam ser utilizados para este fim, o método de população se baseia na associação entre a capacidade de competição ou agressividade dos indivíduos e a produtividade em uma população heterogênea. Mas o risco do uso deste método é a perda de genótipos desejáveis que mostram baixa capacidade de competição nos ensaios de progênies (BORÉM, 1998). Outro método é a seleção recorrente recíproca, que visa aumentar gradativamente a frequência de alelos favoráveis em grupos heteróticos, além de manter a variabilidade genética a cada ciclo para selecionar em ciclos subseqüentes (SOUZA Jr., 2001).

Este trabalho tem como objetivo avaliar as relações genéticas entre as progênies de pupunheira inerme da raça Pampa Hermosa, usando marcadores microssatélites, para facilitar o planejamento dos programas de melhoramento para palmito baseado na escolha de progênies divergentes para cruzamentos controlados.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal e extração de DNA

O Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) mantém um ensaio de progênes de pupunheira inerme da raça Pampa Hermosa, oriundo da região de Yurimáguas, Loreto, Peru, na sua Estação Experimental de Fruticultura Tropical, BR 174, km 38, Manaus, Amazonas, Brasil, com 270 acessos, cada um representado por 60 plantas no campo, e devidamente avaliado em termos de espinhos e componentes de produtividade de palmito. Destes, 46 progênes com plantas selecionadas para comprimento do palmito foram amostrados (6 a 7 plantas por progênie), sendo 11 acessos do rio Cuiparillo (n=75), oito do rio Shanusi (n=55), 11 do rio Paranapura (n=77) e 16 do mercado de Yurimáguas (n=108) (Anexo 1). A amostragem concentrou-se em plantas selecionadas para comprimento do palmito (117 plantas), sendo 78 plantas com palmito > 45 cm, 22 plantas > 54 cm e 17 plantas > 60cm; 198 plantas não selecionadas (< 45 cm) também foram analisadas para permitir melhor comparação entre plantas selecionadas e não selecionadas na mesma população e progênie.

O DNA foi extraído com o reagente DNAzol (Life Technologies), utilizando-se 100 mg de meristema apical de um estipe lateral, com praticado por Clement *et al.* (1997). Após a extração, o DNA foi quantificado em gel de agarose 0,9%, corado com brometo de etídio.

4.2.2 Amplificação dos *loci* microssatélites

Oito dos dez pares de ‘primers’ microssatélites desenvolvidos por Rodrigues *et al.* (2004b) foram selecionados para a genotipagem das plantas. Adicionou-se a extremidade 5’ do ‘primer forward’ de cada *locus* a sequência M13 (5’ TGTAACGACGGCCAGT 3’), e uma outra sequência M13 foi marcada com fluorocromo específico (6-FAM, HEX e TAMRA), segundo o protocolo de Schuelke (2000) com algumas modificações. A reação de PCR foi

conduzida utilizando-se um volume total de 10 µl, contendo 1 µl de tampão 10X (TrisHCl 100 mM, KCl 500 mM, pH 8.4), 1 µl dNTP (2,5 µM), 1 µl de MgCl₂ (25 mM), 0,25 µl Primer Forward M13 (5 µM), 0,25 µl Primer Forward M13 marcado com FAM, Hex ou TAMRA (5 µM), 0,5 µl Primer Reverse (5 µM), 1,5 U Easy Taq DNA Polymerase (Lambda Gene), e 15 ng de DNA genômico. As amplificações foram realizadas em termociclador MJ Research PTC-100 seguindo o programa: 94 °C por 2 min; 25 ciclos de 94°C por 10 seg, a temperatura de anelamento do primer T_a por 20 seg, 72 °C por 30 seg; um ciclo de 72 °C por 10 min, 20 ciclos de 94°C por 10 seg, 50 °C por 20 seg, 72 °C por 30 seg, e uma extensão a 72 °C por 30 min. Os produtos de PCR gerados foram visualizados em seqüenciador automático (Mega Bace 1000). A estimativa do tamanho dos alelos (em pares de bases) foi realizada com o programa Genetic Profiler e Fragment Profiler (GE Healthcare, England), auxiliado pelo marcador de peso molecular (Size Standard) ET-400-ROX (GE Healthcare, England).

4.2.3. Análise genética dos dados

O número de alelos (**A**), a heterozigosidade observada (**Ho**) e a esperada (**He**) com respectivo desvio padrão (SE), e o coeficiente de endogamia (**f**) foram calculados para cada progênie, utilizando o programa GENETIX (BELKHIR *et al.*, 2000). Para determinar a relação genética entre as progênies foi estimada a distância de alelos compartilhados (**D_{As}**) (CHAKRABORTY & JIN, 1993) calculada com o programa Populations 1.2.28 (LANGELLA, 2002). As progênies foram agrupadas pelo método NJ (Neighbour Joining) com o programa MEGA versão 3.1 (KUMAR *et al.*, 2004). Um histograma de distribuição de freqüências das estimativas das distâncias entre as progênies foi obtido a partir da matriz de distâncias de alelos compartilhados (**D_{As}**).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variabilidade genética dentro das progênes selecionadas de pupunheira foi alta, como observado pelas altas heterozigosidades observada e esperada e o número de alelos de cada progênie (Tabela 1). A heterozigosidade observada (H_o) variou de 0,48 (Sh109) a 0,82 (Pa114) e a esperada 0,48 (Me393) a 0,71 (Cup335) para os oito **loci** microssatélites. Considerando que as progênes aqui analisadas são de polinização aberta e pelo fato de pupunheira ser alógama, altas estimativas de heterozigosidade eram esperadas para estas progênes, o que pode ser confirmado pelas altas taxas de cruzamento observadas por Rodrigues (ver capítulo 5).

A endogamia no conjunto de progênes não foi diferente de zero e variou entre as progênes desde -0,122 (Pa143) a 0,154 (Sh109), mostrando valores negativos para a maioria das progênes, o que é evidência de panmixia na polinização das progênes. Essa alta heterozigosidade poderá ser resultado do impacto da prospecção que deu origem ao ensaio, o qual geralmente favorece indivíduos heterozigotos, como discutido por Hayati **et al.** (2004) em populações de dendê (*Elaeis guineensis* L.) mantidas em coleções de germoplasma na África. Os valores positivos de endogamia detectados em algumas progênes são explicados por cruzamentos entre parentes e autofecundações, como observado por Rodrigues (veja capítulo 5).

Tabela 1 - Estimativa de diversidade genética e endogamia em 46 progênes selecionadas de pupunheira (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes*) inerte da raça Pampa Hermosa (Yurimáguas, Peru), mantidas em ensaio de progênes pelo INPA, Manaus, AM, Brasil, com oito *loci* microssatélites. N – número de plantas; N_{sel} – planta selecionada; A – número de alelos; H_e – Heterozigosidade esperada; H_o - Heterozigosidade observada; f - Coeficiente de endogamia; () – Desvio padrão (SE); Cup – rio Cuiparillo; Sh – rio Shanusi; Pa – rio Paranapura; Me – Mercado de Yurimáguas.

Progênes	N	N _{sel}	A	H _e	H _o	f
Cup177	7	1	4,0	0,55 (0,220)	0,63 (0,349)	-0,066
Cup188	7	6	4,1	0,62 (0,086)	0,70 (0,205)	-0,042
Cup295	7	3	4,5	0,60 (0,149)	0,63 (0,317)	0,025
Cup300	7	2	5,1	0,71 (0,111)	0,79 (0,275)	-0,037
Cup302	7	2	4,1	0,61 (0,124)	0,64 (0,253)	0,018
Cup303	7	1	4,8	0,65 (0,077)	0,68 (0,183)	0,032
Cup310	7	1	4,5	0,65 (0,102)	0,71 (0,216)	-0,023
Cup318	7	1	3,9	0,56 (0,169)	0,59 (0,269)	0,020
Cup319	7	4	4,6	0,63 (0,096)	0,74 (0,151)	-0,096
Cup322	6	2	4,8	0,66 (0,126)	0,73 (0,217)	-0,017
Cup335	6	3	4,3	0,62 (0,154)	0,70 (0,280)	-0,037
Sh10	6	2	4,3	0,69 (0,062)	0,70 (0,280)	0,095
Sh73	7	3	3,6	0,58 (0,089)	0,70 (0,232)	-0,117
Sh80	7	4	3,6	0,61 (0,124)	0,65 (0,200)	0,008
Sh81	7	4	4,1	0,61 (0,107)	0,61 (0,132)	0,072
Sh82	7	2	4,6	0,67 (0,071)	0,71 (0,200)	0,025
Sh107	7	3	4,0	0,64 (0,087)	0,72 (0,266)	-0,052
Sh109	7	1	3,8	0,52 (0,271)	0,48 (0,280)	0,154
Sh111	7	1	4,0	0,54 (0,145)	0,56 (0,213)	0,056
Pa114	7	6	5,0	0,68 (0,070)	0,82 (0,210)	-0,125
Pa117	7	2	3,6	0,57 (0,140)	0,68 (0,180)	-0,104
Pa120	7	5	4,5	0,67 (0,096)	0,66 (0,317)	0,093
Pa143	7	2	4,3	0,62 (0,212)	0,82 (0,293)	-0,240
Pa144	7	1	4,0	0,61 (0,076)	0,71 (0,132)	-0,100
Pa153	7	1	4,1	0,66 (0,086)	0,75 (0,146)	-0,061
Pa157	7	1	4,9	0,64 (0,058)	0,65 (0,193)	0,060
Pa159	7	7	4,5	0,64 (0,087)	0,67 (0,202)	0,032
Pa163	7	2	4,8	0,66 (0,075)	0,77 (0,131)	-0,079
Pa168	7	4	5,4	0,71 (0,074)	0,81 (0,182)	-0,053
Pa344	7	2	4,9	0,68 (0,069)	0,80 (0,170)	-0,092
Me13	7	2	4,5	0,60 (0,150)	0,67 (0,261)	-0,036
Me191	7	1	4,8	0,66 (0,129)	0,79 (0,228)	-0,123
Me206	7	2	5,0	0,71 (0,046)	0,81 (0,201)	-0,045
Me218	7	3	4,6	0,66 (0,087)	0,71 (0,153)	-0,008
Me275	6	2	3,6	0,56 (0,124)	0,58 (0,211)	0,063
Me276	6	1	3,8	0,59 (0,095)	0,69 (0,295)	-0,052
Me277	7	3	4,4	0,63 (0,111)	0,76 (0,198)	-0,132
Me280	7	1	4,6	0,61 (0,142)	0,66 (0,285)	0,002
Me362	7	5	4,4	0,56 (0,267)	0,67 (0,351)	-0,106
Me369	7	4	3,6	0,58 (0,148)	0,70 (0,158)	-0,126
Me382	7	4	4,9	0,66 (0,146)	0,74 (0,294)	-0,042
Me384	7	1	3,6	0,62 (0,105)	0,73 (0,258)	-0,100
Me387	6	3	3,9	0,62 (0,100)	0,73 (0,235)	-0,085
Me393	7	2	3,8	0,48 (0,153)	0,50 (0,305)	0,032
Me394	6	1	4,5	0,63 (0,175)	0,68 (0,274)	0,031
Me409	7	3	5,0	0,66 (0,111)	0,70 (0,208)	0,02
Média	6,8	2,5	4,3	0,62	0,69	-0,030

As distâncias genéticas de alelos compartilhados (D_{AS}) variaram de 0,03 a 0,76, com distância média de 0,42 (Tabela 2). A distribuição de frequências das distâncias genéticas mostrou que 55% das distâncias genéticas (D_{AS}) entre as progênes concentra-se num intervalo de 0,30-0,50, seguindo um padrão de distribuição normal (Figura 1) e mais uma vez evidenciando a elevada variabilidade genética das progênes no ensaio, como observado por Rodrigues (veja capítulo 3). Sousa (2003) avaliou clones de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* Mart.) com marcadores RAPD e observou o mesmo padrão normal de distribuição de frequências das similaridades, concluindo que o germoplasma avaliado representa a variabilidade da espécie, dentro da amplitude de variação observada.

Tabela 2 - Distância de alelos compartilhados (D_{AS}) médias, mínima e máxima entre as 46 progênes selecionadas de pupunheira (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes*) inerme da raça primitiva Pampa Hermosa (Yurimáguas, Peru) mantidas em ensaio de progênes pelo INPA, Manaus, AM, Brasil, com oito *loci* microsatélites. Cup – rio Cuiparillo, Sh – rio Shanusi, Pa – rio Paranapura, Me – Mercado de Yurimáguas.

Progênie	Mínimo	Máximo	Média	Progênie	Mínimo	Máximo	Média
Cup177	0,17	0,62	0,42	Pa144	0,28	0,76	0,49
Cup188	0,25	0,7	0,49	Pa153	0,25	0,7	0,45
Cup295	0,05	0,64	0,31	Pa157	0,11	0,76	0,52
Cup300	0,09	0,64	0,34	Pa159	0,22	0,73	0,42
Cup302	0,09	0,71	0,36	Pa163	0,32	0,66	0,51
Cup303	0,05	0,65	0,33	Pa168	0,11	0,67	0,43
Cup310	0,2	0,71	0,41	Pa344	0,19	0,67	0,4
Cup318	0,27	0,76	0,53	Me13	0,06	0,68	0,38
Cup319	0,18	0,67	0,4	Me191	0,18	0,64	0,39
Cup322	0,21	0,6	0,4	Me206	0,15	0,6	0,39
Cup335	0,2	0,64	0,43	Me218	0,19	0,6	0,37
Sh10	0,02	0,52	0,33	Me275	0,09	0,62	0,33
Sh73	0,21	0,7	0,45	Me276	0,15	0,73	0,37
Sh80	0,2	0,7	0,39	Me277	0,2	0,57	0,41
Sh81	0,21	0,7	0,43	Me280	0,06	0,63	0,41
Sh82	0,16	0,52	0,34	Me362	0,21	0,71	0,46
Sh107	0,23	0,65	0,44	Me369	0,29	0,72	0,49
Sh109	0,18	0,7	0,49	Me382	0,02	0,56	0,38
Sh111	0,51	0,76	0,63	Me384	0,2	0,64	0,43
Pa114	0,18	0,7	0,42	Me387	0,15	0,6	0,38
Pa117	0,27	0,7	0,47	Me393	0,23	0,68	0,48
Pa120	0,18	0,62	0,38	Me394	0,13	0,72	0,35
Pa143	0,21	0,74	0,47	Me409	0,24	0,72	0,49

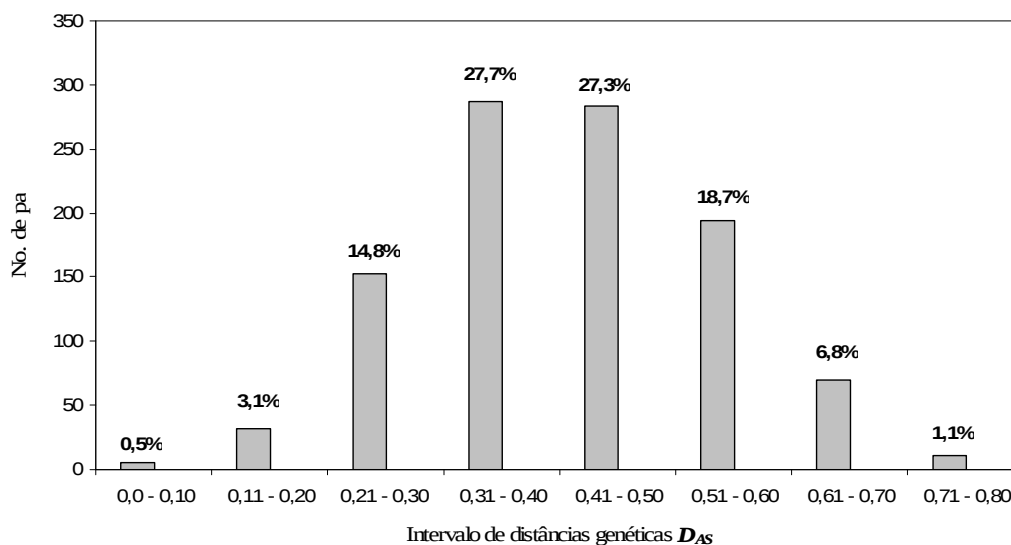


Figura 1 - Distribuição de freqüências das estimativas de distância genética D_{AS} entre as 46 progênes selecionadas de pupunheira (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes*) inerme da raça primitiva Pampa Hermosa (Yurimáguas, Peru) mantidas em ensaio de progênes pelo INPA, Manaus, AM, Brasil.

As progênes Sh111, Pa144, Pa157 e Cup318 apresentaram as maiores distâncias (0,76), indicando uma maior divergência para estas progênes. Essas informações, associada às características produtivas exclusivas de determinadas populações, poderão orientar o planejamento dos cruzamentos entre e dentro das populações. As menores distâncias (0,02-0,09) foram detectadas nas progênes Sh10, Cup295, Cup300, Cup302, Cup303, Me13, Me275, Me280 e Me382, indicando que estas progênes são muito similares.

O dendrograma das populações baseado em D_{AS} agrupado por Neighbour Joining (NJ) mostra maior afinidade entre Shanusi e o mercado, e entre Paranapura e Cuiparillo (Figura 2). Em contraste, o dendrograma das progênes (Figura 3) mostra que a maioria dos grupos de progênes é formada independentemente de sua origem geográfica; a mesma ausência de estrutura populacional foi evidente quando as progênes do mercado foram eliminadas do dendrograma (Figura 4), bem como quando as distâncias de Nei (1978) ou de Rogers foram usadas (dados não apresentados). Este resultado corrobora a quase ausência de estrutura genética e o alto fluxo gênico detectados por Rodrigues (ver capítulo 3). Resultados similares

foram encontrados para acessos de tâmara (*Phoenix dactilifera* L.) de várias populações na Tunísia, os quais exibiram uma organização genética independente de sua origem geográfica (ZEHDI *et al.*, 2004).

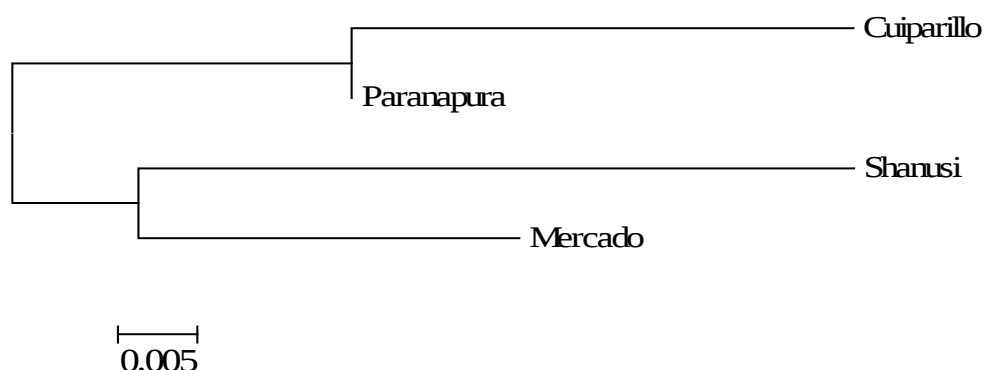


Figura 2 - Dendrograma baseado em distância genética D_{AS} mostrando as relações genéticas entre as três populações e do mercado (Yurimáguas, Peru) de amostras de pupunheira (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes*) mantidas em ensaio de progênies pelo INPA, Manaus, AM, Brasil

Conseqüentemente, nossos resultados demonstram o alto relacionamento genético das progênies no ensaio de Yurimáguas, com algumas progênies e alguns grupos de progênies mais divergentes que outros. A implicação para a escolha de um método de melhoramento para a pupunheira é que o método de população (BORÉM, 1998) é o mais direito. Para adoção do método de seleção recorrente, como praticado no dendê (PURBA *et al.*, 2000), seria necessário criar populações baseadas na informação morfométricas com a informação das divergências genéticas sendo usada para adicionar progênies especialmente divergentes.

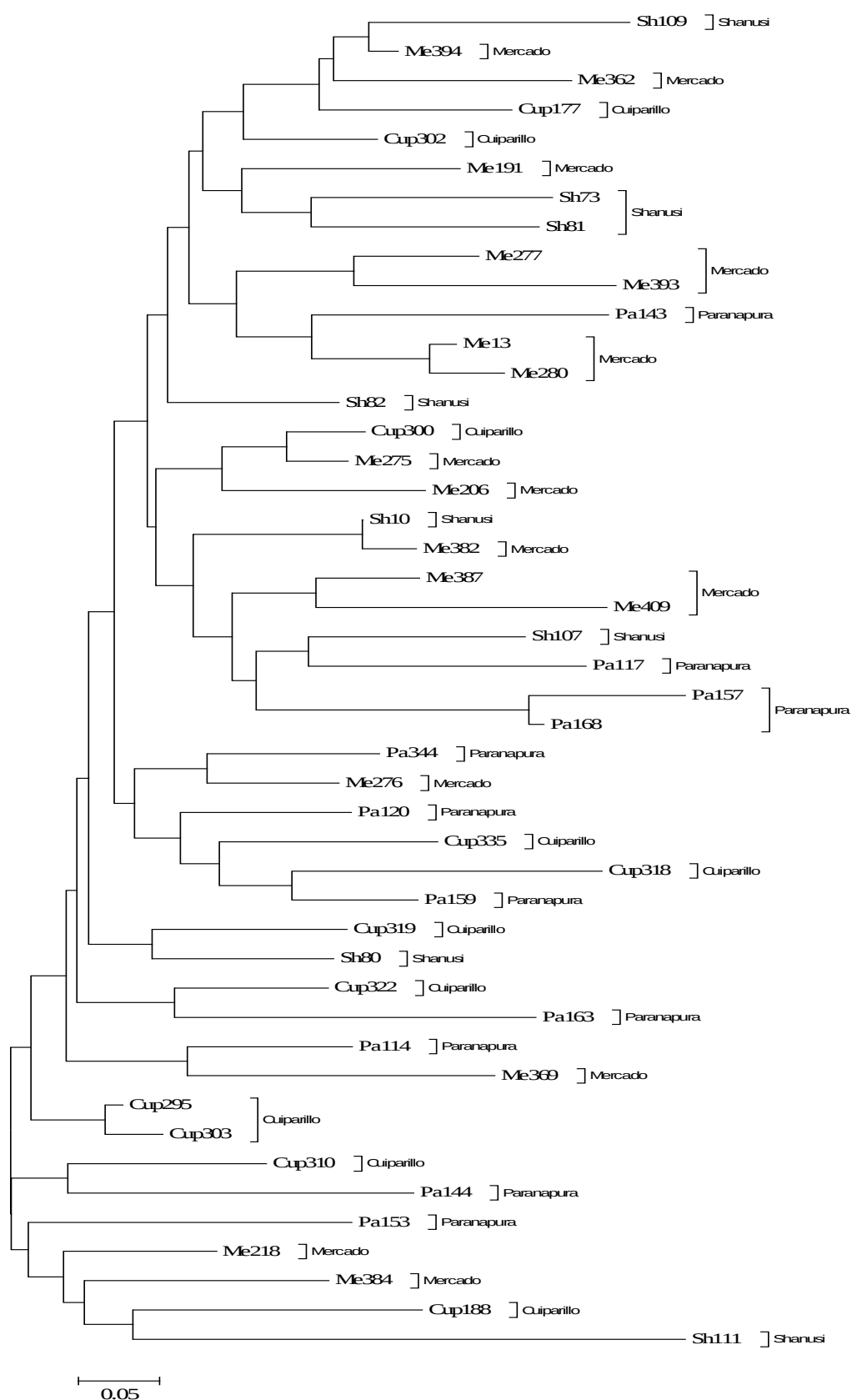


Figura 3 - Dendrograma baseado em distância genética D_{AS} mostrando as relações genéticas de 46 progênies selecionadas de pupunheira (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes*) da raça primitiva Pampa Hermosa (Yurimáguas, Peru) mantidas em ensaio de progênies pelo INPA, Manaus, AM, Brasil.

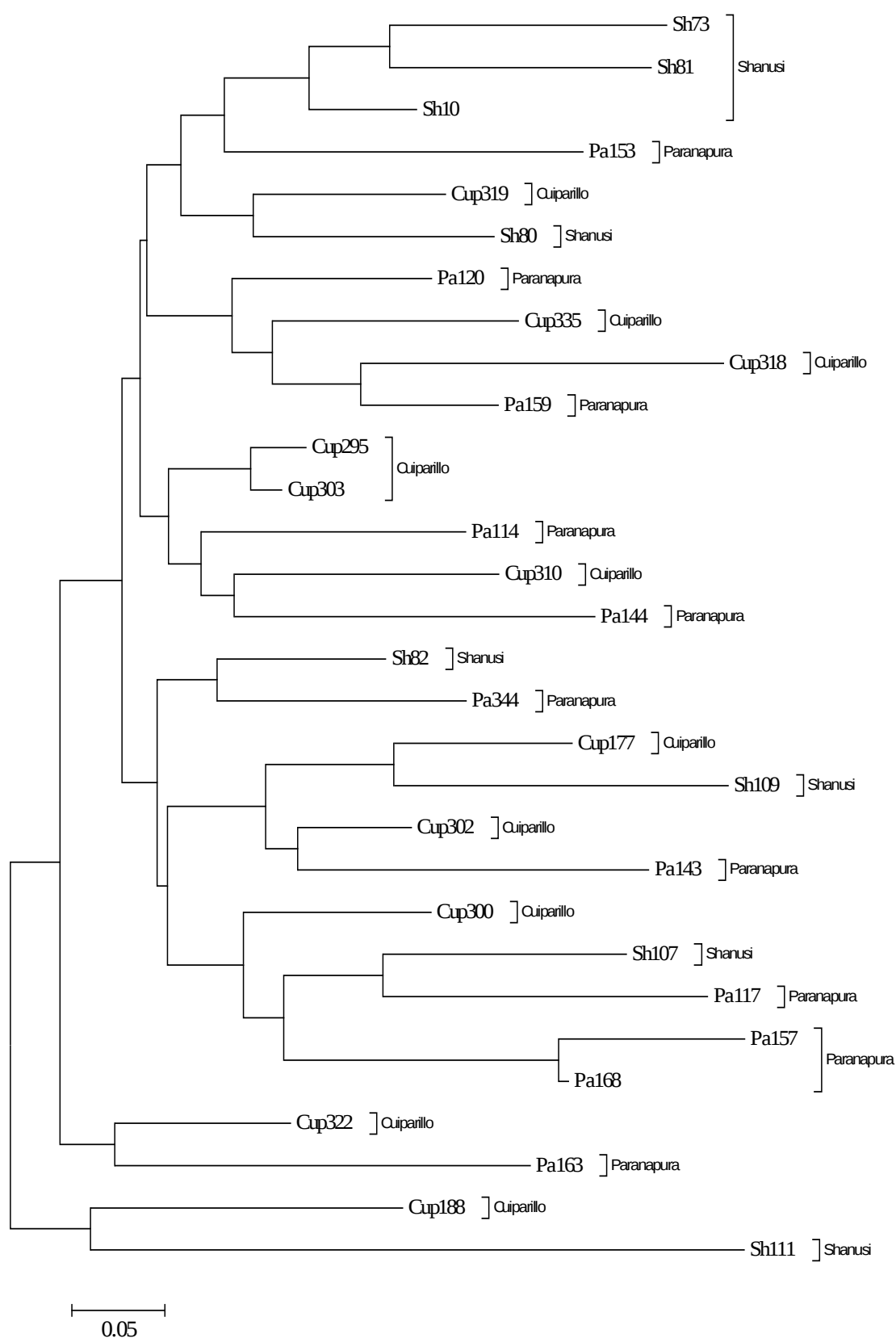


Figura 4 - Dendrograma baseado em distância genética D_{AS} mostrando as relações genéticas de 30 progênies selecionadas das populações dos rios Cuiparillo, Shanusi e Paranapura de pupunheira (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes*) da raça primitiva Pampa Hermosa (Yurimáguas, Peru) mantidas em ensaio de progênies pelo INPA, Manaus, AM, Brasil.

4.4. CONCLUSÃO

As distâncias genéticas mostram alto relacionamento entre as progênies selecionadas do ensaio de Yurimáguas, apesar de algumas progênies terem se destacado como divergentes. As análises de agrupamento evidenciam a formação de grupos de progênies independentes de sua origem geográfica, apesar do agrupamento de populações demonstrarem maior afinidade entre Shanusi e mercado, e Paranapura e Cuiparillo. Estas informações serão úteis no programa de melhoramento da espécie para orientar cruzamentos controlados entre progênies dentro de cada população (método de população) com base nas características morfométricas e nas divergências genéticas, para tentar maximizar a heterozigosidade dentro das populações, e posteriormente entre populações (seleção recorrente), permitindo a formação de grupos heteróticos que poderão ter maiores ganhos genéticos.

5 SISTEMA DE REPRODUÇÃO DE PUPUNHEIRA DA RAÇA PRIMITIVA PAMPA HERMOSA INFERIDO DE PROGÊNIES SELECIONADAS USANDO MICROSSATÉLITES

RESUMO

A pupunheira cultivada (*Bactris gasipaes*, Palmae) é uma palmeira domesticada e tem se destacado no mercado pela produção de palmito de alta qualidade, principalmente na região Sudeste do país. O mercado encontra-se em expansão, mais a demanda por sementes melhoradas é um ponto crítico. O objetivo deste trabalho foi definir o sistema de reprodução de *B. gasipaes*, usando oito *lócus* microssatélites e 24 progênies de polinização aberta de três populações da raça Pampa Hermosa mantidas em ensaio de progênies para fins de melhoramento genético. O sistema de reprodução foi analisado pelo modelo misto de reprodução e pelo modelo de cruzamentos correlacionados. As taxas de cruzamento *multilocus* foram altas para as populações, variando de 0,95 a 0,99, indicando que a pupunheira cultivada possui um sistema misto de reprodução, com predomínio de fecundação cruzada. A taxa de cruzamento individual por progênie foi igualmente alta, variando de 0,9 a 1,0, confirmando o sistema misto da espécie. A taxa de cruzamentos entre parentes ($t_m - t_s$) foi significativa (variando de 0,101 a 0,202), mostrando a existência de indivíduos parentes dentro das progênies, provavelmente decorrente da prática agrícola de plantar sementes de polinização aberta de poucas matrizes na mesma roça. A estimativa da correlação de paternidade foi baixa (variando de 0,051 a 0,112), indicando pequena proporção de irmãos-completos dentro das progênies e grande número de doadores de pólen (9 a 20) participando dos cruzamentos individuais. Portanto, as progênies do ensaio de Yurimáguas são compostas em sua maioria por meios-irmãos, evidenciada pela alta taxa de cruzamento, alto número de doadores de pólen e baixa correlação de paternidade, e que a estimativa de parâmetros genéticos no ensaio de progênies pode ser baseada nos modelos clássicos de genética quantitativa aplicados para espécies exclusivamente alógamas.

Palavras-chave: pupunheira inerme, ensaio de progênies, endogamia biparental, taxa de cruzamento

MATING SYSTEM OF PEACH PALM OF THE PAMPA HERMOSA LANDRACE INFERRED FROM SELECTED PROGENIES USING MICROSATELLITES

ABSTRACT

The peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) is a domesticate and is currently important for the production of high quality heart-of-palm, mainly in southeastern Brazil. The market is in expansion and the demand for seeds of improved plants is a critical point. The objective of this study was to define the mating system of peach palm, using eight microsatellite loci and 24 open-pollinated progenies of three populations of the Pampa Hermosa landrace maintained in a progeny trial for genetic improvement. The mating system was analyzed by the mixed mating model and by the correlated crosses model. The multilocus crossing rate was high for all populations, varying from 0.95 to 0.99, confirming that peach palm has mixed mating system in which allogamy predominates. The individual crossing rate for progenies was equally high, varying from 0.9 to 1.0, confirming the mixed mating system. The outcrossing rate among relatives ($t_m - t_s$) was significant, varying from 0.101 to 0.202, identifying the existence of related individuals within populations, probably due to the farmers' practice of planting seeds of a small number of open-pollinated seed-sources in the same swidden-fallow plot. The estimate of paternity correlation was low, varying from 0.051 to 0.112, suggesting a small number of full sibs within the progenies and a great number of pollen sources (9 to 20) participating in the progenies' pollination. The progenies of this trial are composed principally by half sibs, as shown by the high out-crossing rate, large number of pollen sources and low paternity correlation. This suggests that the estimation of genetic parameters in the progeny trial can be based on the classic models of quantitative genetics applied for exclusively allogamous species.

Keywords: spineless peach palm, progeny trial, biparental inbreeding, outcrossing rate

5.1 INTRODUÇÃO

O modo de transmissão dos alelos em plantas é determinado pelo sistema de cruzamento (WRIGHT, 1921), o qual pode ser autofecundação, fecundação cruzada ou mista de autofecundação e cruzamentos. O conhecimento sobre como os alelos poderão ser combinados na próxima geração permite o estabelecimento de estratégias de seleção de genótipos superiores e a manutenção da variabilidade genética para uso futuro em programas de melhoramento. Assim sua caracterização e a estimação das taxas de cruzamento são importantes para o estudo da dinâmica dos alelos em populações naturais e em programas de melhoramento, bem como para a definição de estratégias de manejo e conservação (ALVES *et al.*, 2003).

Os níveis de diversidade genética entre e dentro das populações podem ser influenciados pelo sistema de reprodução e os mecanismos de dispersão do pólen e sementes (HAMRICK & NASON, 1993). Por isso, estudos do sistema de reprodução e fluxo gênico são fundamentais em programas de melhoramento e conservação genética. As estimativas das taxas de cruzamento e o número de doadores de pólen dentro e entre progênie e populações podem elucidar melhor a estrutura genética destas populações e contribuir para a escolha do método mais adequado para a estimativa de parâmetros genéticos, o estudo da herança de caracteres quantitativos, a seleção de genótipos superiores, e a definição de tamanhos amostrais para a coleta de sementes.

A pupunheira cultivada (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes* Kunth) é uma palmeira domesticada que tem se destacado no mercado pela produção de palmito de alta qualidade e seu agronegócio encontra-se em expansão, principalmente na região Sudeste do país. As sementes disponíveis no mercado hoje são oriundas da raça primitiva Pampa Hermosa, Yurimáguas, Peru (BOVI, 1997), por serem inermes e mais produtivas que outras populações

(MORA URPI **et al.**, 1999). A propagação de pupunheira é geralmente realizada por sementes obtidas a partir de polinização aberta.

A inflorescência monóica aparece nas axilas de folhas senescentes, com flores unissexuadas masculinas e femininas. Devido à diferença entre a antese masculina e feminina numa mesma inflorescência (24 horas), a pupunheira é predominantemente alógama (MORA URPI **et al.**, 1997). Existem três mecanismos de polinização na pupunheira: o primeiro efetuado por Curculionídea pertencente aos gêneros *Andranthobius* e *Phyllotrox*, que são pequenos besouros com autonomia de vôo reduzida (entre 100 e 500 m; MEXZON **et al. apud** MORA URPI **et al.**, 1997); o segundo pelo vento; e o terceiro pela gravidade (MORA URPI & SOLIS, 1980).

Apesar de ser alógama a autopolinização pode ocorrer e, conseqüentemente, a endogamia pode ser mais ou menos freqüente. Um sistema de auto-incompatibilidade genética que garantiria a alogamia foi sugerido (MORA URPI, 1982), mas Clement & Arkcoll (1984) observaram que a auto-incompatibilidade varia de 0 a 88% na população de Benjamim Constant (raça Putumayo) quando a polinização foi manual. Também, quando a pupunheira cresce em touceira, existe a possibilidade de autopolinização entre estipes da touceira. Clement (1988) observou que a prática agrícola tradicional é de plantar várias mudas de polinização aberta oriundas da mesma matriz selecionada (meios-irmãos) na mesma roça, o que permite cruzamentos entre parentes, resultando em endogamia biparental igual ao coeficiente de coancestria entre os indivíduos cruzados. Cole **et al.** (2007) detectaram níveis significativos de endogamia nas populações de comunidades de camponeses e indígenas no Peru, como resultado de cruzamentos entre este tipo de progênie de polinização aberta durante muitas gerações (como sugerido por CLEMENT, 1988). No capítulo 3, observaram-se coeficientes de endogamia significativos nas três populações de pupunheira da raça Pampa

Hermosa na região de Yurimáguas, as quais são a base genética do melhoramento genético para produção de palmito em diversas instituições latino-americanas.

Atualmente os marcadores tipo microssatélites apresentam grandes vantagens para determinar o sistema de reprodução, pois exibem herança mendeliana simples, são multi-alélicos e tem expressão codominante (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). Estudos do sistema de reprodução baseados em microssatélites têm sido realizados em várias espécies tropicais, como *Swietenia macrophylla* (LEMES, 2000), *Cariniana legalis* (SEBBENN *et al.*, 2000), *Theobroma grandiflorum* (ALVES *et al.*, 2003) e *Euterpe edulis* (GAIOTTO *et al.*, 2003, SEOANE *et al.*, 2005).

O objetivo deste estudo foi investigar o sistema de reprodução de pupunheira com o uso de **lócus** microssatélites avaliados em progênes de polinização aberta oriundas de três populações da raça Pampa Hermosa mantidas em ensaio de progênes. A intenção é gerar informações sobre o sistema de reprodução para entender a estrutura genética das progênes e populações a fim de possibilitar o planejamento de cruzamentos de forma rápida e eficiente em programas de melhoramento da espécie.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Material vegetal e extração de DNA

As análises foram feitas em progênes coletadas em comunidades ao longo de três rios na região de Yurimáguas, Peru, e instaladas em ensaio de progênes no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (Estação Experimental de Fruticultura Tropical, BR 174, km 38, Manaus, AM, Brasil). A amostragem concentrou-se em progênes selecionadas para comprimento do palmito, sendo nove progênes do rio Cuiparillo (n=121 plantas), sete do rio Shanusi (n=133) e oito do rio Paranapura (n=105) (identificação das plantas no Anexo 1).

O DNA foi extraído com o reagente DNAzol (Life Technologies), utilizando-se 100 mg de meristema apical de um estipe lateral, com praticado por Clement *et al.* (1997). Após a extração, o DNA foi quantificado em gel de agarose 0,9% corado com brometo de etídio.

5.2.2 Amplificação dos *lôcus* microssatélites

Oito dos dez pares de iniciadores microssatélites desenvolvidos por Rodrigues *et al.* (2004b) foram selecionados para a genotipagem das plantas. Adicionou-se à extremidade 5' do 'primer forward' de cada *lôcus* a sequência M13 (5' TGTAACGACGGCCAGT 3'), e uma outra sequência M13 foi marcada com fluorocromo específico (6-FAM, HEX e TAMRA), segundo o protocolo de Schuelke (2000) com algumas modificações. A reação de PCR foi conduzida utilizando-se um volume total de 10 µl, contendo 1 µl de tampão 10X (TrisHCl 100 mM, KCl 500 mM, pH 8.4), 1 µl dNTP (2,5 µM), 1 µl de MgCl₂ (25 mM), 0,25 µl Primer Forward M13 (5 µM), 0,25 µl Primer Forward M13 marcado com FAM, Hex ou TAMRA (5 µM), 0,5 µl Primer Reverse (5 µM), 1,5 U Easy Taq DNA Polymerase (Lambda Gene), e 15 ng de DNA genômico. As amplificações foram realizadas em termociclador MJ Research PTC-100 seguindo o programa: 94 °C por 2 min; 25 ciclos de 94°C por 10 seg, a temperatura de anelamento do primer T_a por 20 seg, 72 °C por 30 seg; um ciclo de 72 °C por 10 min, 20 ciclos de 94°C por 10 seg, 50 °C por 20 seg, 72 °C por 30 seg, e uma extensão a 72 °C por 30 min. Os produtos de PCR gerados foram visualizados em seqüenciador automático (Mega Bace 1000). A estimativa do tamanho dos alelos (em pares de bases) foi realizada com o programa Genetic Profiler e Fragment Profiler (GE Healthcare, England), auxiliado pelo marcador de peso molecular (Size Standard) ET-400-ROX (GE Healthcare, England).

5.2.3 Análise genética

A taxa de cruzamento foi caracterizada a partir das taxas **unilocus** e **multilocus** por meio de estimativas de máxima verossimilhança (RITLAND & JAIN 1981), utilizando o programa MLTR - Multilocus Mating System Program (RITLAND, 2004), baseado no modelo de cruzamento misto de Ritland & Jain (1981) e cruzamentos correlacionados de Ritland (2004). Utilizou-se o algoritmo EM (Máximas Esperanças) devido ao pequeno número de progênies por população, conforme sugere Ritland (2004). Foram estimadas: 1) a taxa de cruzamento **multilocus** (t_m); 2) a taxa de cruzamento média **unilocus** (t_s); 3) a taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados ($t_m - t_s$); 4) a correlação da taxa de cruzamento (ou autofecundação) entre as progênies (r_t); 5) a correlação de paternidade de cruzamento entre dois irmãos, ou a proporção de irmãos-completos entre irmãos de cruzamento dentro das progênies (r_p); e 6) a correlação de cruzamento (ou autofecundação) entre **lócus** dentro das progênies (r_s). O erro padrão das estimativas foi estimado por reamostragem “bootstrap”, onde as unidades de amostragem foram as plantas dentro das progênies para a taxa de cruzamento individual por progênie e as progênies para a taxa de cruzamento populacional. Utilizaram-se 1.000 reamostragens entre e dentro das progênies (RITLAND, 2004).

O coeficiente de coancestria entre plantas dentro de progênies (θ_{xy}) foi estimado do coeficiente de correlação de parentesco entre plantas dentro de progênies (r_{xy}), proposto por Ritland (1989), $\hat{r}_{xy} = 0,25(1 + \hat{F}_a)[4\hat{s} + (\hat{t}_m^2 + \hat{t}_m\hat{s}\hat{r}_s)(1 + \hat{r}_p)]$, em que, s é a taxa de autofecundação ($\hat{s} = 1 - \hat{t}_m$). Os demais parâmetros já foram previamente definidos. Como em espécies diplóides o coeficiente de coancestria é a metade do coeficiente r_{xy} $\hat{\theta}_{xy} = \hat{r}_{xy} / 2$ (LYNCH E WALSH, 1998), tem-se que $\Theta_{xy} = 0,125(1 + \hat{F}_a)[4\hat{s} + (\hat{t}_m^2 + \hat{t}_m\hat{s}\hat{r}_s)(1 + \hat{r}_p)]$.

O tamanho efetivo de variância foi estimado de acordo com Cockerham (1969) por,

$$\hat{N}_{e(v)} = 0.5 / \hat{\Theta}_{xy}$$

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estimativas da taxa de cruzamento **multilocus** (t_m) e **unilocus** (t_s) usando oito **lócus** microsatélites foram altas para todas as populações de pupunheira, variando de 0,95 a 0,99, sugerindo um sistema misto de reprodução com predomínio de fecundação cruzada (Tabela 1). Altas estimativas de cruzamento têm sido encontradas para outras palmeiras, como ***Astrocaryum mexicanum*** (EQUIARTE *et al.*, 1992), ***Euterpe edulis*** (GAIOTTO *et al.* 2003; SEOANE *et al.*, 2005) e ***Cocos nucifera*** (AKUBA, 2006), assim como para espécies arbóreas tropicais (WARD *et al.*, 2005). A taxa de cruzamento individual por progênie (Tabela 1) também foi alta em progênies das três populações, com baixa variação entre as progênies. A julgar pelo erro padrão da média entre os **lócus**, apenas a progênie 7 da população Shanusi e a progênie 2 da Paranapura apresentaram valores estatisticamente diferentes de 1,0. A estimativa da correlação de autofecundação confirma a baixa variação observada na taxa de cruzamento entre progênies dentro de populações, confirmando que a maioria das progênies nas populações foram oriundas de exocruzamentos.

Considerando que as taxas de cruzamento foram próximas a 1,0 em todas as populações, a autofecundação em estas progênies ($s = 1 - t_m$) é muito baixa (máximo de 5% em Cuiparillo). De acordo com Ritland (2002) para baixos níveis de autofecundação ($s < 0,2$), a correlação de t entre **lócus** (r_s) corresponde à fração de endogamia devido a endogamia uniparental, e $(1 - r_s)$ à fração da endogamia devido a endogamia biparental. Sendo assim, a baixa endogamia aqui detectada está fracionada em cruzamentos uniparentais e biparentais, com uma pequena variação entre as populações (Tabela 1).

Em pupunheira estas altas taxas de cruzamento podem ser explicadas por um ou ambos dos seguintes fatores: a) pelo fato das sementes terem sido coletadas durante o pico da safra (informação verbal)¹, o que aumentaria a possibilidade de varias plantas contribuírem para os cruzamentos devido ao grande número de insetos visitando as inflorescências durante

¹WANDERS CHÁVEZ, 2006

o pico da floração; e b) pela fenologia de floração de pupunheira (sincronismo de floração) associado ao comportamento do polinizador, favorecendo a exogamia (MORA URPÍ & SOLIS, 1980).

Tabela 1 - Parâmetros de endogamia, parentesco e sistema de reprodução em três populações de pupunheira cultivada *Bactris gasipaes* var. *gasipaes*.

Taxa de Cruzamento	Cuiparillo	Shanusi	Paranapura
Progênie 1	1,0 (0,000) - [12]	1,0 (0,000) - [30]	1,0 (0,000) - [10]
Progênie 2	0,95 (0,047) - [20]	1,0 (0,000) - [27]	0,92 (0,076) - [12]
Progênie 3	1,0 (0,000) - [14]	1,0 (0,000) - [24]	1,0 (0,000) - [12]
Progênie 4	1,0 (0,000) - [15]	1,0 (0,000) - [17]	1,0 (0,000) - [12]
Progênie 5	1,0 (0,000) - [12]	1,0 (0,000) - [15]	1,0 (0,000) - [25]
Progênie 6	0,92 (0,004) - [11]	1,0 (0,000) - [10]	1,0 (0,000) - [12]
Progênie 7	0,94 (0,051) - [16]	0,9 (0,075) - [10]	1,0 (0,000) - [10]
Progênie 8	1,0 (0,000) - [11]		1,0 (0,000) - [12]
Progênie 9	1,0 (0,000) - [10]		
Taxa de cruzamento multilocus - t_m	0,95 (0,024)	0,98 (0,012)	0,99 (0,010)
Taxa de cruzamento unilocus - t_s	0,85 (0,034)	0,78 (0,040)	0,88 (0,030)
Endogamia biparental - $t_m - t_s$	0,101 (0,020)	0,202 (0,033)	0,109 (0,028)
Correlação da estimativa de $t - r_t$	0,070 (0,037)	0,116 (0,021)	0,080 (0,022)
Correlação da estimativa de p multilocus - r_p	0,066 (0,020)	0,112 (0,022)	0,051 (0,018)
Correlação de t entre locus (Fração de autofecundação devido endogamia uniparental) - r_s	0,556 (0,068)	0,394 (0,071)	0,627 (0,093)
Fração de autofecundação devida Endogamia biparental - $1-r_s$	0,44	0,61	0,34
Número de doadores de pólen - $1/r_p$	15,2	9	19,6
Taxa de autofecundação - $\hat{s}$	0,05	0,02	0,01
Índice de fixação parental - F	0,00 (0,000)	0,00 (0,000)	0,00 (0,000)
Coancestria dentro das progênies - θ_{xy}	0,146	0,132	0,134
Tamanho efetivo de variância - $N_{e(v)}$	3,4	3,8	3,7
Número total de plantas - N	121	133	105

[] – número de plantas na progênie; () Desvio padrão

A diferença entre a taxa de cruzamento **multilocus** e **unilocus** ($t_m - t_s$) foi significativamente diferente de zero para as três populações (variando de 0,101 a 0,202), evidenciando uma endogamia de origem biparental (causada por cruzamento entre parentes), principalmente nas progênes da população do rio Shanusi (Tabela 1). A endogamia biparental aqui detectada provavelmente é decorrente da prática agrícola de plantar progênes de polinização aberta de poucas matrizes na mesma roça (como sugerido por CLEMENT, 1988, e observado por COLE *et al.*, 2007). Outra causa poderia ser a presença de estruturação genética espacial dentro das populações, como tem sido relatada em estudos do sistema de cruzamento de populações naturais e fragmentadas de outra palmeira tropical, **Euterpe edulis** (GAJOTTO *et al.*, 2003; SEOANE *et al.*, 2005). Cruzamentos entre parentes têm sido relatados em diversos estudos do sistema de reprodução de espécies arbóreas tropicais (LEMES, 2000; SEBBENN *et al.*, 2000; ALVES *et al.*, 2003) e demonstram que certos níveis de endogamia biparental podem ser esperados em populações naturais; em plantas cultivadas a esperança de que este ocorre é grande, pois é comum ter poucas fontes de sementes numa parcela agrícola.

A correlação de paternidade (r_p) dentro das progênes foi baixa, variando de 0,051 a 0,112, sugerindo que a maioria das progênes foram oriundas de cruzamentos com várias fontes de pólen, o qual corresponde ao alto número de doadores de pólen (Tabela 1). A estimativa do número de doadores de pólen variou de nove a 20 por população. Este valor é muito superior ao detectado em **Euterpe edulis** (máximo 9, SEOANE *et al.*, 2005), confirmando a hipótese de que várias plantas participaram como polinizadoras das progênes avaliadas. Isto pode ser explicado primeiramente pelo fato das sementes terem sido coletadas durante o pico da safra, o que aumenta a possibilidade de várias plantas contribuírem para os cruzamentos, reduzindo a taxa de cruzamentos correlacionados que geram irmãos completos. Baixas estimativas de correlação de paternidade implicam em um maior número de doadores

de pólen (RITLAND, 1989), como observado em Parapapura e Cuiparillo, e um pouco menor em Shanusi (Tabela 1). Este fato poderá ter relação direta com o comportamento do polinizador associado ao sincronismo no florescimento, propiciando um maior número de besouros visitando as flores femininas advindos de outras inflorescências (MORA URPI E SOLIS, 1980). Estas baixas estimativas de correlação de paternidade sugerem que o número de cruzamentos correlacionados ($t_m \times r_p$) é baixo (máximo de 10,2%) e conseqüentemente o número de cruzamentos aleatórios [$t_m (1 - r_p)$] é alto (mínimo de 89,8% em Shanusi). Isto sugere ainda que as progênies são formadas quase que exclusivamente por meios-irmãos.

A estimativa do coeficiente médio de coancestria dentro de progênies (Tabela 1) foi próximo ao esperado em progênies de meios-irmãos (0,125), confirmando os resultados anteriores. Isto sugere que, sob cruzamentos aleatórios no presente teste de progênies, pode se esperar uma endogamia variando de 13,2 a 14,6%. Contudo, esta endogamia pode ser quebrada pela seleção para genótipos superiores dentro de progênies, reduzindo os parentescos dentro das parcelas, de forma que o presente ensaio pode ser usado futuramente como fonte de sementes melhoradas (pomar de sementes). A estimativa do tamanho efetivo de variância reforça, mais uma vez, a hipótese de que as progênies são compostas predominantemente por meios-irmãos ($N_{e(v)} = 4$; SEOANE *et al.*, 2005).

Logo, a constatação de que o ensaio de progênies de Yurimáguas é composto quase que exclusivamente por plantas advindas de exocruzamentos permite inferir que este apresenta elevada variabilidade genética, evidenciada pelo alto número de doadores de pólen. Também, a estimativa de parâmetros genéticos e seleção para produção de palmito poderão ser baseadas nos modelos clássicos de genética quantitativa aplicados para uma espécie exclusivamente alógama, os quais pressupõem cruzamentos aleatórios, ausência de endogamia na geração parental ($f=0$) e progênies compostas exclusivamente por meios-irmãos, visto que o nível de endogamia detectado é muito baixo.

5.4 CONCLUSÃO

Conclui-se que *Bactris gasipaes* é de reprodução mista, predominantemente alógama. As altas taxas de cruzamento demonstram que as progênes analisadas são oriundas quase que exclusivamente por indivíduos provenientes de exocruzamento, provavelmente devido ao estágio fenológico (pico da safra) e ao sincronismo de floração associado ao comportamento do polinizador. Será importante repetir este estudo no início e no fim da floração para examinar como varia as taxas de cruzamento. A variação entre as taxas de cruzamento entre progênes é baixa, o que pode ser constatado pela pequena variação nas taxas de cruzamentos individuais por família. As progênes são compostas predominantemente por meios irmãos. Uma discreta endogamia foi detectada nas três populações, sendo de origem uniparental e biparental. Portanto, as progênes do ensaio são compostas em sua maioria por meios-irmãos com elevada variabilidade genética, evidenciada pelo alto número de doadores de pólen, e sugere que a seleção para produção de palmito poderá ser baseada nos modelos clássicos de genética quantitativa aplicados para espécies exclusivamente alógamas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo aqui apresentado sugere algumas direções para a pesquisa com a pupunha:

- ✓ Aumentar o número de acessos/progênie para a análise de estrutura genética populacional, amostrando uma planta ou no máximo três plantas por progênie para incluir toda a raça Pampa Hermosa disponível às instituições locais e nacionais;
- ✓ Avaliar outros acessos/populações da raça Pampa Hermosa mantidas no Banco Ativo de Germoplasma de Pupunha com o intuito de buscar novos alelos que possam ser incluídos no programa para aumentar a divergência genética entre progênie e populações;
- ✓ Ampliar o número de locos de marcadores microsatélites para cobrir maior parte do genoma e possibilitar a melhor discriminação dos genótipos individuais;
- ✓ Como as análises do sistema de reprodução foram realizadas em progênie oriundas do pico de floração, sugere-se uma nova análise a partir de coletas fora do pico de floração, bem como incluindo a planta mãe.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIN, A.; WEBER J.C.; SOTELO MONTES, C.; VIDAURRE, H.; VOSMAN, B.; SMULDERS, M.J.M. Genetic differentiation and trade among populations of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) in the Peruvian Amazon - implications for genetic resource management. **Theoretical Applied Genetics**, v. 108, p. 1564–1573, 2004.

AKUBA, R.H., Analysis of the mating system and genetic equilibrium in coconut composite varieties (*Cow nuafera* L.) using microsatellite markers. 2006. 51p. Thesis (Doutorado) - Institute for Coconut and Palmae, Manado, Indonesia.

ALI, M.; COPELAND, L.O.; ELIAS, S.G.; KELLY, J.D. Relationship between genetic distance and heterosis for yield and morphological traits in winter canola (*Brassica napus* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, n. 1, p. 118-121, 1995.

ALMEYDA, N.; MARTIN, F.W. **Cultivation of neglected tropical fruits with promise. Part 8. The pejibaye.** Mayaguez: Institute of Agriculture, Science and Administration. New Orleans: USA, 1980. 10p.

ALVES, R.M.; ARTERO, A.S.; SEBBENN, A.M.; FIGUEIRA, A. Mating system in natural population of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng) Schum., by microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 3, p. 373-379, 2003.

BARBOSA NETO, J.F.; HERNÁNDEZ, C.M.; O'DONOUGHUE, L.S.; SORRELIS, M.E. Precision of genetic relationship estimates based on molecular markers. **Euphytica**, Netherlands, v. 98, n. 1-2, p. 59-67, 1997.

BEACH, J.H. The reproductive biology of the peach or "pejibaye" palm (*Bactris gasipaes*) and a wild congener (*B. porschiana*) in the Atlantic lowlands of Costa Rica. **Principes**, v.28, n.3, p.107-119, 1984.

BELKHIR, K.; GOUDET, J.; CHIKHI, L.; BONHOMME, F. **Genetix (ver. 4.01)**, logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations. Montpellier, France. 2000.

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

_____; COUVREUR, T.; MARSEILLAC, N.; BROTTIER, P.; PERTHUIS, B.; VALLEJO, M.; NOYER, J.-L.; JACQUEMOUD-COLLET, J.-P.; RISTERUCCI, A.M.; PINTAUD, J.-C. A new set of microsatellite markers for the peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth): characterization and across-taxa utility within the tribe Cocoeae. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p. 580–582, 2004.

BOREÍM, A. **Melhoramento de Plantas**. 2.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998, p.453.

BOVI, M.L.A. Expansão do cultivo da pupunheira para palmito no Brasil. **Horticultura Brasileira**, v.15, p.183-185, 1997. (Suplemento)

_____. O agronegócio palmito de pupunha. **O Agrônômico**, Campinas, v.52, n.1, p.10-12, 2000.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.9, p.816-827, 1998.

BROWN, A.H.D.; ALLARD, R.W. Estimation of mating systems in open-pollinated maize populations using isozymes polymorphisms. **Genetics**, v.66, p.133-145, 1970.

CHAKRABORTY, R.; JIN, L. A unified approach to study hypervariable polymorphisms: statistical considerations of determining relatedness and population distances. In: CHAKRABORTY, R; EPPLEN, J.T.; JEFFREYS, A.J. (eds). DNA Fingerprinting: state of the science. Birkhauser verlag, p.153-175, 1993.

CHAVEZ FLORES, W.B.; NODA, H.; CLEMENT, C.R. Genetic/phenotypic studies on spines in peijibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K. Palmae). **Revista Brasileira de genética**, v.13, n.2, p.305-312, 1990.

CLEGG, M.T. Measuring plant mating systems. **Bioscience**, v.30, n.12, p.814-818, 1980.

CLEMENT, C.R; ARKCOLL, D.B. Observações sobre autocompatibilidade em pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K. Palmae). **Acta Amazônica**, v.14, n.3-4, p.337-342, 1984.

_____. The peijibaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.) as an agroforestry component. **Agroforestry Systems**, v.4, p.205-219, 1986a.

_____. Descriptores mínimos para el pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.) y sus implicaciones filogenéticas. 1986b. 216p. Dissertação (Mestrado) - Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San Jose.

_____. Pupunha: uma árvore domesticada. **Ciência Hoje**, v.5, n.29, p.42-49, 1987.

_____; MORA URPI, J. The pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K., Arecaceae): mult-use potential for the lowland humid tropics. **Economic Botany**, v.41, n.2, p.302-311, 1987.

_____. Domestication of the pejibaye palm (*Bactris gasipaes*): past and present. In: BALICK, M.J. (Ed.). The Palm - Tree of Life. Biology, Utilization and Conservation. **Advances in Economic Botany**, New York, 1988, v.6, p.155-174.

_____; CHÁVEZ FLORES, W.B.; MOREIRA GOMES, J.B. Considerações sobre a pupunha como produtora de palmito. In: Encontro Nacional de Pesquisadores em Palmito, 1., Curitiba, 1988. **Anais**. Curitiba: CNPF/IAPAR/IAC, 1988, p. 225-247.

_____. Growth and genetic analysis of pejibaye (*Bactris gasipaes* Kunth, Palmae) in Hawaii. 1995. 221p. Tese (Doutorado) - University of Hawaii at Manoa, Honolulu, USA.

_____. Pupunha: Recursos genéticos, pesquisas realizadas e tecnologias disponíveis. In: Workshop sobre as Culturas de Cupuaçu e Pupunha na Amazônia, Manaus, 1996. **Anais**. Manaus: Embrapa, CPAA, 1996. p.33-49.

_____. Pupunha: Recursos genéticos para a produção de palmito. **Horticultura Brasileira**, v.15, p.186-191, 1997. (Suplemento)

_____; ARADHYA, M.K.; MANSCHARDT, M.R. Allozyme variation in spineless pejibaye (*Bactris gasipaes* Palmae). **Economic Botany**, v.51, n.2, p.149-157, 1997.

_____; BOVI, M.L.A. Melhoramento genético da pupunheira: conhecimentos atuais e necessidades. In: Seminário do Agronegócio Palmito de Pupunha na Amazônia, Porto Velho, 1999, **Anais**. Porto Velho: Embrapa, CPAF, 1999, p.57-70. (Documentos 41)

_____. Pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth, Palmae). **Série Frutas Nativas**, Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2000. p.48.

_____. Melhoria de espécies nativas. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (Eds.). **Recursos genéticos e melhoramento: plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.423-441.

_____. YUYAMA, K.; CHÁVEZ FLORES, W.B. Recursos genéticos de pupunheira. In: SOUSA, N.R.; SOUZA, A.G.C. (Eds.). **Recursos fitogenéticos na Amazônia Ocidental: conservação, pesquisa e utilização**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2001. p. 143-187.

COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequency. **Evolution**, v.23, p.72-84, 1969.

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

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

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

CREGAN, P. B.; BHAGWAT, A.A.; AKKAYA, M. S.; RONGWEN, J. Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean. **Methods of Molecular and Cellular Biology**, v.8, p. 1585-1592, 1999.

DIAS, L.A.S.; KAGEYAMA, P.Y. Variação genética em espécies arbóreas e consequências para o melhoramento florestal. **Agrotrópica**, v.3, n.3, p.119-127, 1982.

ECHT, C.S.; MAY-MARQUARDT, P. Survey of microsatellite DNA in pine. **Genome**, v.40, p. 9-17, 1997.

EGUIARTE, L.E.; PEREZNASSER, N.; PINERO, D. Genetic-structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum Mexicanum* (Tropical Palm) - Implications for evolution and conservation. **Heredity**, v.69, p.217-228, 1992.

EVETT, I.W.; GILL, P.D.; LAMBERT, J.A.; OLDROYD, N.; FRAZIER, R.; WATSON, S.; PANCHAL, S.; CANNOLLY, A.; KIMPTON, C. Statistical analysis of data for three British

ethnic groups from a new STR multiplex. **International Journal of Legal Medicine**, v.10, p.5-9, 1997.

EXCOFFIER, L.G.L.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p.47-50, 2005.

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1987. 279p.

FARIAS NETO, J.T.; RESENDE, M.D.V. Aplicação da metodologia de modelos mistos (REML/BLUP) na estimação de componentes de variância e predição de valores genéticos em pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.2, p.320-324, 2001.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: Embrapa, Cenargen, 1996. 220p.

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

_____; GRATTAPAGLIA, D.; VENCOSKY, R. Genetic structure, mating systems, and long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). **Journal of Heredity**, v.94, n.5, p.399-406, 2003.

GLAUBITZ, J.C. CONVERT: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p.309–310, 2004.

GOODMAN, S.J. R_{ST} Calc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and a determining their significance. **Molecular Ecology**, v.6, p.881-885, 1997.

GOUDET, J. **FSTAT**: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (software). version 2.9.3.2, 2002. Disponível em: <<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>>. Acesso em: 5 de abril de 2006.

GRATTAPAGLIA, D. Molecular markers for forest trees: where are we going? In: BORÉM, A.; GIÚDICE, M.P.; SAKIYAMA, N.S. (Eds.). **Plant breeding in the turn of the millennium**. Viçosa:Univ. Viçosa, 1999. p. 79-101.

HAMRICK, J.L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, v.69, n10, p.1685-1693, 1982.

_____. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: SCONEWALD-COX, C.M; CHAMBERS, S.M.; MACBRYDE, B.; THOMAS, W.L. (Ed) **Genetic and Conservation**. Menlo Park: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1983. p.335-348.

_____.; MURAWSHI, D.A.; NASON, J.D. The influence of seed dispersal mechanism on the genetic structure of tropical tree populations. **Vegetatio**, v.107/108, p.281-297, 1993.

HANCOCK, J.F. **Plant evolution and the origin of crop species**, 2.ed. Wallingford: Ed. CABI Publishing, Oxon, UK, 2004.

HARTL, D.L. **A Primer of Population Genetics**, 3.ed. Sanderland: Harvardy University, 2000. 542p.

HARTLEY, C.W.S. **The oil palm. *Elaeis guineensis* Jacq.** Longman, London.(Tropical Agriculture Series). 1977. 806p.

HAYATI, R.; WICKNESWARI, R.; MAIZURA, I.; RAJANAIDU, N. Genetic diversity of oil palm (***Elaies guineensis*** Jacq.) germoplasm collections from Africa: implications for improvement and conservation of genetic resources. **Theoretical Applied Genetics**, v.108, p.1274-1288, 2004.

HERNÁNDEZ, J.A. Descripción de la diversidad y estructura genética de las poblaciones silvestres y cultivadas de pejibaye (***Bactris gasipaes*** Kunth), y sus relaciones de parentesco, utilizando marcadores microsatélites. 2005. 79p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Costa Rica, San José.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v.5, p.150-163, 2004.

LANGELLA, O. Population 1.2.28. Logiciel de génétique des populations. (Software). France: CNRS, 2002. Disponível em: < <http://www.cnrs-gif.fr/pge/>>. Acessado em: 10 abril de 2006.

LEMES, M.R. Population genetic structure and mating system of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae) in the Brazilian Amazon: Implications for conservation. 2000. 167p. Thesis (Doctor Philosophy) - University of Stirling, Stirling, UK.

LISTABARTH, C. Pollination of *Bactris* by *Phyllotrox* and *Epurea*: Implications of the palm breeding beetles on pollination at the community level. *Biotropica*, v.28, p.69-81, 1996.

LIVINI, C.; AJMONE MARSAN, P.; MELCHINGER, A.E.; MESSMER, M.M.; MOTTO, M. Genetic diversity of maize inbred lines within and among heterotic groups revealed by RFLP. *Theoretical Applied Genetics*, v.84, p.17-25, 1992.

LYNCH, M; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 980p.

MARSHALL D.K.; BROWN, A.H.D. Optimum sampling strategies in genetic conservation. In: O.H. FRANKEL & J.G.R. HAWKES (Eds.). **Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow**. Cambridge: Cambridge University Press, 1975. p.53-70.

MARTÍNEZ, A.K.; GAÍTAN-SOLIS, E.; DUQUE, M. C.; BERNAL, R.; TOHME, J. Microsatellite loci in *Bactris gasipaes* (Arecaceae): their isolation and characterization. *Molecular Ecology*, v.2, p.408-410, 2002.

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

MESSMER, M.M.; MELCHINGER, A.E.; HERMANN, R.G.; BOPPENMAIER J. Relationships among early european maize inbreds: I. Comparison of pedigree and RFLP data. *Crop Science*, v.33, p.944-950, 1993.

MICHALAKIS, Y.; EXCOFFIER, L. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*, v.142, p.1061-1064, 1996.

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

MORA URPI, J.; SOLÍS, E.M. Polinización en *Bactris gasipaes* H.B.K. *Revista Biología Tropical*, v.30, n.2, p.174-176, 1980.

_____. Polinización en *Bactris gasipaes* H.B.K. (Palmae): Nota adicional. **Revista Biología Tropical**, v.30, n.2, p.174-176, 1982

_____.; CLEMENT, C.R. Races and populations of peach palm found in the Amazon basin. In: CLEMENT, C.R.; CORADIN, L. (eds.). **Final report (revised): peach palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.) germplasm bank**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia/Centro Nacional de Recursos Genéticos, Amazonas, 1988. p.78-94.

_____. Pejibaye (*Bactris gasipaes*). In: HERNÁNDEZ BERMEJO, J.E.; LEÓN, J. (eds.). **Cultivos marginados: otra perspectiva de 1492 (Producción y protección vegetal**. n.26, Rome: FAO/Jardín Botánico de Córdoba (España), 1992. p.209-220.

_____.; WEBER, J.C.; CLEMENT, C.R. **Peach palm *Bactris gasipaes* Kunth**. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops.20. Rome: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research - IPK, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute - IPGRI, 1997. 83p.

_____.; BOGANTES ARIAS, A.; ARROYO OQUENDO, C. Cultivares de pejibaye para palmito. In: MORA URPI, J.; GAINZA ECHEVERRÍA, J. (Eds.). **Palmito de pejibaye (*Bactris gasipaes* Kunth): su cultivo e industrialización**. San Jose: Editorial de la Universidad de Costa Rica, 1999. p.41-47.

NEI, M. Genetics distances between populations. **American Naturalist**, v.106, p.283-292, 1972.

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

_____. F-statistic of gene diversity in subdivided populations. **Annals of Human Genetics**, v.41, p.225-330, 1977.

_____. Estimation of average heterozygosity and distance from a small number individuals. **Genetics**, v.89, p.593-590, 1978.

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

PERERA, L.; RUSSELL, J.R.; PROVAN, J.; POWELL, W. Identification and characterization of microsatellite loci in coconut (*Cocos nucifera* L.) and the analysis of coconut populations in Sri Lanka. **Molecular Ecology**, v.8, p.335-346, 1999.

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

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

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

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

RAFALSKI, J.A.; VOGEL, J.M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S.V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B.; LAI, E. (eds). **Analysis of non-mammalian genomes - a practical guide**. New York: Academic Press, 1996, p.75-134.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENETPOP (v.1.2): a population genetics software for exact test and ecumenicism. **Journal Heredity**, v.86, p.248-249, 1995.

REIS, M.S. Distribuição e dinâmica de variabilidade genética em populações naturais de palmito (*Euterpe edulis* MARTIUS). 1996. 209p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

RICE, R.W. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v.43, p.223-225, 1989.

RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, v.47, p.35-52, 1981.

_____. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution**, v.43, n.4, p.848-859, 1989.

_____. Series of FORTAN computer programs for estimating plant mating systems. **Journal of Heredity**, v.81, p.235-237, 1990.

_____. Extensions of models for the estimation of mating systems using *n* independent locos. **Heredity**, v.88, p.221-228, 2002.

_____. **Multilocus mating system program – MLTR Version 3.0.** Vancouver, 2004. Disponível em: <<http://genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs.html>>. Acesso em: 14 abril de 2006.

RIVERA, R.; EDWARDS, K.J.; BARKER, J.H.A.; ARNOLD, G.M.; AYAD, G.; HODGKIN, T.; KARP, A. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in *Cocos nucifera* L. **Genome**, v.42, p. 668–675, 1999.

RODRIGUES, D.P.; ASTOLFI-FILHO, S.; CLEMENT, C.R. Molecular marker-mediated validation of morphologically defined landraces of pejibaye (*Bactris gasipaes*) and their phylogenetic relationships. **Genetic Resource and Crop Evolution**, v.51, n.8, p.871-882, 2004a.

_____; VINSON, C.; CIAMPI, A.Y.; FARIAS, I.P.; LEMES, M.R.; ASTOLFI-FILHO, S.; CLEMENT, C.R. Novel microsatellite markers for *Bactris gasipaes* (Palmae). **Molecular Ecology Notes**, v.4, n.4, p.575-576, 2004b.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v.18, p.233-234, 2000.

SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y.; SIQUEIRA, A.C.M.F.; ZANATTO, A.C.S. Taxa de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* Mart. O. Ktze.: Implicações para conservação e melhoramento genético. **Scientia Forestalis**, v.58, p.25-40, 2000.

SEKHON, M.S.; GUPTA, V.P. Genetic distance and heterosis in indian mustard: developmental isozymes as indicators of genetic relationships. **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, p.1148-1152, 1995.

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.

SEOANE, C.E.S.; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Sistema de reprodução em duas populações naturais de *Euterpe edulis* Mart. sob condições de fragmentação florestal. **Scientia Forestalis**, v.69, p.13-24, 2005.

SILVA, C.C. Caracterização molecular (RAPDs) e validação de raças primitivas de pupunha (*Bactris gasipaes*). 2004. 65p. Dissertação (Mestrado) - Universidade São Carlos/Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequency. **Genetics**, v.139, p.457-462, 1995.

SOUSA, N.R. Variabilidade genética e estimativas de parâmetros genéticos em germoplasma de guaranazeiro. 2003. 99p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SOUZA JR, C.L. Melhoramento de espécies alógamas. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento:** plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.190-198.

SOUZA, A.P. Biologia Molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento:** plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.939-365.

STUBER, C.W. Biochemical and molecular markers in plant breeding. In: DUDLEY, J.W., HALLAUER, A.R.; RYDER, M. (Eds.). **Plant breeding reviews**, v.9. John Wiley and Sons, New York, 1992. p.37-61.

TOMLINSON, P.B. **The structural biology of palms**. Oxford: Oxford University Press, 1990.

VENCOVSKY, R. Variance of an estimate of outcrossing rate. **Brazilian Journal of Genetics**, v.17, n.3, p.349-351, 1994.

VILLACHICA, H. Cultivo del pijuayo (*Bactris gasipaes* Kunth) para palmito en la Amazonia. Lima: SPT/TCA, 1996. 153p.

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

WARD, M.; DICK, C.W.; GRIBEL, R.; LOWE, A.J. To self, or not to selfy...A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. **Heredity**, v.95, p.246–254, 2005.

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

_____; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v.38, p.1358-1370, 1984.

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

WRIGHT, S. Systems of mating. **Genetics**, v.6, p.111-178, 1921.

_____. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v.15, p.323-354. 1951.

_____. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. **Evolution**, v.19, p.395-420, 1965.

YUYAMA, K.; CHÁVEZ FLORES, W.B. Comportamento de progênies de meios-irmãos de pupunheira (*Bactris gasipaes*, Kunth). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.18, n.1, p.93-98, 1996.

_____.; CHÁVEZ FLORES, W.B.; CLEMENT, C.R. Pupunheira. In: BRUCKNER, C.H. (Ed.). **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. p.411-422.

_____.; CHÁVEZ FLORES, W.B.; PEREIRA, B.G.; SILVA, I.A. Efeito da densidade de plantas e da adubação NPK na produção inicial de palmito de pupunheira. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.29, p.373-378, 2005.

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

ANEXO A - Número de plantas selecionadas para comprimento de palmito, e não selecionadas amostradas dentro de progênies e populações do ensaio de progênies de Yurimáguas, Peru, para as análises genéticas: (A) – Diversidade genética; (B) – Variação genética entre e dentro ; * - Sistema de reprodução.

Progênie	No.plantas (A)	No.plantas (B)	No.Sel.	>45cm	>54cm	>60cm	População
177*	12	7	1	1			Cuiparillo
188*	21	7	6	5		1	Cuiparillo
295*	13	7	3	1	1	1	Cuiparillo
300*	15	7	2	2			Cuiparillo
302*	12	7	2	1	1		Cuiparillo
303*	11	7	1			1	Cuiparillo
305	6	-	1		1		Cuiparillo
310*	14	7	1	1			Cuiparillo
318*	11	7	1	1			Cuiparillo
319*	10	7	4	2	1	1	Cuiparillo
322	6	6	2	1		1	Cuiparillo
335	9	6	3	3			Cuiparillo
10	6	6	2	2			Shanusi
73*	24	7	3	3			Shanusi
80*	26	7	4	2	2		Shanusi
81*	21	7	4	3	1		Shanusi
82*	13	7	2	2			Shanusi
100*	6	-	0				Shanusi
107*	14	7	3		3		Shanusi
109*	10	7	1	1			Shanusi
111*	10	7	1	1			Shanusi
114*	10	7	6	5	1		Paranapura
117*	11	7	2	2			Paranapura
120	10	7	5	1	3	1	Paranapura
125	7	-	2			2	Paranapura
143	7	7	2	1		1	Paranapura
144	7	7	1	1			Paranapura
153*	10	7	1	1			Paranapura
157*	12	7	1	1			Paranapura
159*	26	7	7	4	1	2	Paranapura
163*	10	7	2	2			Paranapura
168*	10	7	4	4			Paranapura
344*	10	7	2	1	1		Paranapura
13	10	7	2		2		mercado
191	10	7	1		1		mercado
206	10	7	2	1		1	mercado
218	14	7	3	2		1	mercado
258	8	-	2	1		1	mercado
275	6	6	2	1	1		mercado
276	6	6	1	1			mercado
277	10	7	3	1		2	mercado
280	14	7	1	1			mercado
362	19	7	5	2	2	1	mercado
369	9	7	4	4			mercado
382	10	7	4	3		1	mercado
384	10	7	1			1	mercado
387	6	6	3	3			mercado
393	10	7	2	1		1	mercado
394	6	6	1	1			mercado
409	10	7	3	2	1		mercado
Total	568	315	122	79	23	20	

