



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS – UNIMONTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - PPGCB
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Desenvolvimento e otimização de marcadores microssatélites (SSRs) em
***Mauritia flexuosa* (L. f.)**

WILKER FRED SANTOS SOUTO

Montes Claros – Minas Gerais
Novembro – 2009

WILKER FRED SANTOS SOUTO

**Desenvolvimento e otimização de marcadores microssatélites (SSRs) em
Mauritia flexuosa (L. f.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Montes Claros como requisito necessário para a conclusão do curso de Mestrado em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Marcio Antonio Silva Pimenta

Coorientadora: Dra. Ana Yamaguishi Ciampi

Coorientadora: Dra. Elytania Veiga Menezes

Montes Claros – Minas Gerais

Novembro – 2009

WILKER FRED SANTOS SOUTO

**Desenvolvimento e otimização de marcadores microssatélites (SSRs) em
Mauritia flexuosa (L. f.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Montes Claros como requisito necessário para a conclusão do curso de Mestrado em Ciências Biológicas.

APROVADA:

Prof. Dr. Marcio Antonio Silva Pimenta
Orientador/UNIMONTES

Prof. Dr. Henrique Maia Valério
UNIMONTES

Dra. Vânia Cristina Rennó Azevedo
EMBRAPA/DF

A Deus,

Aos meu pais,

Aos meus amigos Nilo Santos, Ana Paula Silva e Flávia França,

DEDICO

A Martha, meu amor, paixão e vida,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS por ser a fonte da vida, o pai criador, meu suporte, minha força, por ter guiado meus passos e de meus companheiros dentro do programa de mestrado, e por estar comigo em todos os momentos da minha vida. A ele tudo agradeço.

A minha noiva Martha por estar do meu lado, ser o PILAR que me sustenta, por dizer sempre para NÃO DESISTIR nos momentos em que pensei que fosse cair. Ela que me apara sempre, sempre e sempre! A ti tudo agradeço meu bem.

Aos meu pais, Raimundo Nonato Souto Cardoso e Maria Creusa Santos Cardoso, que sempre me fizeram acreditar e mesmo que o sonho estivesse longe, me disseram pra continuar. A vocês devo absolutamente tudo.

A minha avó Maria Júlia de Miranda Souto (*in memorian*), que apesar de não estar presente fisicamente, sempre esteve em meus pensamentos, sonhos e de certa forma me mostrando o verdadeiro caminho.

Ao meu orientador Marcio, por ser uma pessoa perseverante, amigo, por ter compreendido cada momento que passei dentro da pesquisa, por ter me ajudado, aconselhado e até mesmo nos “puxões de orelha”, sem ele este trabalho não seria possível.

À Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), e especialmente ao programa de pós-graduação *strictu sensu* em Ciências Biológicas, representados por todos os professores e funcionários, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao CNPq pelo apoio financeiro que tornou possível a realização deste trabalho.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), em especial a Dra. Vânia Cristina Rennó Azevedo, por ter cedido o espaço onde boa parte da pesquisa foi realizada, por ser paciente e compreensiva.

À Dra. Ana Yamaguishi Ciampi pelo explêndido conhecimento divido e por ter se disposto a ajudar e coorientar.

À Dra. Elytania Veiga Menezes por ter sido as minhas mãos nos momentos em que não pude, por ter me ensinado, guiado e coorientado.

Aos meus eternos amigos, a quem nunca poderia esquecer, sem eles meus caminhos seriam cheios de pedras. Vocês que me fizeram acreditar, me fizeram ver com olhos que acho que sem a ajuda de vocês nunca os teria. A Nilo José Santos, Ana Paula Silva, Flávia França e mesmo aqueles que não foram citados.

Ao pessoal do laboratório de métodos analíticos, ao Paulo, ao Márcio Guedes que me ajudaram muito nos momentos de coleta do material, nas infinitas idas a campo, mas que de certa forma foram proveitosas e hilárias, a Lígia, a Leide e todos que diretamente ou indiretamente fizeram parte dessa pesquisa e com certeza possuem créditos neste trabalho.

A todos vocês, sem exceções, o meu muito **OBRIGADO!!**

BURITI

Árvore da vida.
Solene, solitária, solidária.

Nas entranhas da terra e em cúpula celeste:
ramificações estranhas, demarcando várzeas celebrando oásis
matinais.

Óleo e copa, alimento e proteção de vida.

Das entranhas da terra ao firmamento, uma simetria de volumes
invertidos: no espaço aberto e no solo contido, ampulheta de vida.

Buritizais descendo geografias aquáticas no roteiro dos pássaros
e tropeiros.

Escamas cárneas lustrosas avermelhadas.

Não se sabe se é a palmeira que passa ou o tropeiro que fica.

Testemunhas silentes mas não indiferentes pois o buriti é dadivoso
umbrátil altaneiro.

Enquanto houver buritizais, enquanto houver mananciais
enquanto houver chuvas lodaçais
enquanto e portanto o milagre da existência,
entretanto, vida e pranto.

(Antônio Miranda)

Porque a palavra de Deus é viva, e eficaz, e mais cortante do que qualquer espada de
dois gumes, e penetra até ao ponto de dividir alma e espírito, juntas e medulas, e é
apta para discernir os pensamentos e propósitos do coração.

(Hebreus 4:12)

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. JUSTIFICATIVA.....	3
3. OBJETIVOS.....	4
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
4.1. ORIGEM E DIVERSIDADE GENÉTICA EM PLANTAS.....	5
4.2. EFEITOS GENÉTICOS DO EXTRATIVISMO.....	5
4.3. CONSERVAÇÃO DE ESPÉCIES ARBÓREAS TROPICAIS.....	6
4.4. A ESPÉCIE <i>MAURITIA FLEXUOSA</i>.....	8
4.4.1. ASPECTOS TAXONÔMICOS E BOTÂNICOS.....	8
4.4.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO BURITI.....	10
4.4.3. UTILIZAÇÃO DO BURITI.....	12
4.5. A ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE PLANTAS.....	13
4.6. MARCADORES MOLECULARES PARA ANÁLISE GENÉTICA.....	15
4.6.1. MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	18
4.6.2 APLICAÇÕES DE MARCADORES NA CONSERVAÇÃO AMBIENTAL.....	22
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
5.1. ÁREAS DE ESTUDO.....	24
5.2. MATERIAL BIOLÓGICO PARA ESTUDOS GENÉTICOS.....	25
5.3. EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DO DNA.....	25
5.4. CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA GENÔMICA ENRIQUECIDA.....	26
5.4.1. SELEÇÃO DA ENZIMA PARA DIGESTÃO DO DNA.....	27
5.4.2. ELUIÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA EM GEL DE AGAROSE.....	29
5.4.3. LIGAÇÃO DO DNA AOS ADAPTADORES E LIGAÇÃO DE BIOTINA AOS OLIGONUCLEOTÍDEOS.....	30
5.4.4. ENRIQUECIMENTO DA BIBLIOTECA - PREPARO DAS CONTAS MAGNÉTICAS PARA HIBRIDIZAÇÃO.....	31

5.4.5. HIBRIDIZAÇÃO DO DNA+ADAPTADOR AO COMPLEXO BIO-OLIGOS-CONTA E PCR PARA CONTROLE DO ENRIQUECIMENTO DA BIBLIOTECA.....	32
5.4.6. PURIFICAÇÃO DAS REAÇÕES DE PCR APÓS A HIBRIDIZAÇÃO.....	34
5.4.7. LIGAÇÃO DO DNA AO PLASMÍDEO PGEM-T, TRANSFORMAÇÃO E REPICAGEM DE COLÔNIAS.....	35
5.4.8. SELEÇÃO DE CLONES POSITIVOS PARA SSR.....	36
5.4.9. PCR DOS INSERTOS.....	37
5.4.10. REAÇÃO DE EXO/SAP.....	38
5.4.11. PCR E REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	39
5.4.12. DESENHO DOS INICIADORES.....	40
5.4.13. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS LOCOS SSR.....	42
5.5. METODOLOGIA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	44
5.5.1. ESTIMATIVA DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS.....	44
5.5.2. ESTIMATIVA DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS.....	44
5.5.3. ESTIMATIVA DOS ÍNDICES DE DIVERSIDADE GENÉTICA.....	45
5.6. TRANSFERIBILIDADE PARA A ESPÉCIE <i>ORBIGNYA OLEIFERA</i> (BUR.).....	47
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
6.1. DESENVOLVIMENTO DE BIBLIOTECAS ENRIQUECIDAS COM LOCOS MICROSSATÉLITES	48
6.2. ENRIQUECIMENTO E REENRIQUECIMENTO DA BIBLIOTECA GENÔMICA DE MICROSSATÉLITES.....	49
6.3. SEQUENCIAMENTO, ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS E VALIDAÇÃO DOS PRIMERS.....	49
6.4. ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA.....	53
6.4.1. ESTIMATIVA DO TAMANHO E DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS.....	53
6.4.2. ESTIMATIVA DOS ÍNDICES DE DIVERSIDADE GENÉTICA.....	58
6.5. TRANSFERIBILIDADE DOS MARCADORES SSRs DE <i>M. FLEXUOSA</i>.....	62
7. CONCLUSÃO.....	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - (A) ÁRVORE DE <i>MAURITIA FLEXUOSA</i> NA APA PANDEIROS; (B) VISTA DA REGIÃO ABAXIAL DAS FOLHAS DA PALMEIRA; (C) CACHO DE FLORES MADUROS E SECOS.....	9
FIGURA 2 - VEREDA DA ÁREA DE PRESERVAÇÃO AMBIENTAL (APA) - PANDEIROS COM VISÃO DOS BURITIS (<i>MAURITIA FLEXUOSA</i>).....	11
FIGURA 3 - ESQUEMA DE ANÁLISE EM GEL DE MARCADOR MICROSSATÉLITE EM TRÊS GENÓTIPOS DIPLÓIDES DE PLANTAS (P ₁ , P ₂ E F ₁).....	19
FIGURA 4 - LOCALIZAÇÃO DO MUNICÍPIO DE JANUÁRIA.....	24
FIGURA 5 - ESQUEMA REPRESENTATIVO ADAPTADO DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO DE DNA PELO MÉTODO CTAB 2%.....	26
FIGURA 6 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS ETAPAS DA CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA ENRIQUECIDA COM MICROSSATÉLITES.....	27
FIGURA 7 - GEL DE ELETROFORESE DO ENSAIO DE DIGESTÃO ENZIMÁTICA COM AS ENZIMAS MSEI, SAU3A E TSP509.....	28
FIGURA 8 - PRIMEIRA QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA DO BURITI.....	29
FIGURA 9 - (A) SEGUNDA QUANTIFICAÇÃO FEITA COM O PENTE DE 4 POÇOS UNIDOS, UTILIZANDO OS MARCADORES Kb E ØX174 (B) QUANTIFICAÇÃO DA ELUIÇÃO DOS FRAGMENTOS DE 200 A 800 PB UTILIZANDO O MARCADOR Kb.....	30
FIGURA 10 - NA SETA AZUL O IMÃ UTILIZADO PARA SEPARAR AS CONTAS MAGNÉTICAS (BEADS) DAS SOLUÇÕES AQUOSAS. NA SETA VERDE O EPPENDORF COM A SOLUÇÃO.....	32
FIGURA 11 - RESULTADO DA PCR PARA CONTROLE DO ENRIQUECIMENTO DA BIBLIOTECA.....	33
FIGURA 12 - QUANTIFICAÇÃO DA PCR DAS BEADS.....	34
FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO DO VETOR DE CLONAGEM PGEM.....	35
FIGURA 14 - CUBA DE ELETROPORAÇÃO UTILIZADA NO PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA.....	36
FIGURA 15 - PLACA DEEPWELL COM FUNDO EM U.....	37
FIGURA 16 - RESULTADO DA ELETROFORESE DA PCR DAS AMOSTRAS DE INSERTO.....	38
FIGURA 17 - ESQUEMA DA REAÇÃO DE EXOSAP UTILIZADA NO PROCESSO.....	39
FIGURA 18 - SEQUENCIADOR DE DNA CAPILAR ABI 3100 DA APPLIED BIOSYSTEMS.....	40

FIGURA 19 - SCREEN DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS (MF18) DO GEL DE POLIACRILAMIDA A 5% FEITA PELO PROGRAMA <i>BIORAD QUANTIFY</i>.....	44
FIGURA 20 - REPRESENTAÇÃO DE UMA PLACA DE PETRI CONTENDO AS BACTÉRIAS <i>ESCHERICHIA COLI</i> XL1-BLUE TRANSFORMADAS.....	49
FIGURA 21 - PORCENTAGEM DOS MOTIVOS MICROSSATÉLITES PERFEITOS E COMPOSTOS E AS FREQUÊNCIAS DE MOTIVOS DINUCLEOTÍDEOS E TRINUCLEOTÍDEOS.....	50
FIGURA 22 - ELETROFEROGRAMA (MF9) CONTENDO REGIÃO MICROSSATÉLITE RICA EM AG DO DNA DE BURITI (<i>M. FLEXUOSA</i>).....	50
FIGURA 23 - PORCENTAGEM DE REDUNDÂNCIA NOS <i>PRIMERS FORWARD</i> E <i>REVERSE</i>.....	51
FIGURA 24 - PORCENTAGEM DE REDUNDÂNCIA NOS <i>PRIMERS FORWARD</i>.....	51
FIGURA 25 - MOTIVOS MICROSSATÉLITES MAIS FREQUENTES IDENTIFICADOS EM <i>MAURITIA FLEXUOSA</i>.....	52
FIGURA 26 - HISTOGRAMA DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DOS SEIS LOCOS MICROSSATÉLITES, ESTIMADOS PARA 24 INDIVÍDUOS DA POPULAÇÃO 1 DE <i>MAURITIA FLEXUOSA</i>. O EIXO Y INDICA A FREQUÊNCIA ALÉLICA E O EIXO X INDICA O NÚMERO DO ALELO, EM PARES DE BASE. AS RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS SE ENCONTRAM ACIMA DE CADA COLUNA.....	56
FIGURA 27 - HISTOGRAMA DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DOS SEIS LOCOS MICROSSATÉLITES, ESTIMADOS PARA 20 INDIVÍDUOS DA POPULAÇÃO 2 DE <i>MAURITIA FLEXUOSA</i>. O EIXO Y INDICA A FREQUÊNCIA ALÉLICA E O EIXO X INDICA O NÚMERO DO ALELO, EM PARES DE BASE. AS RESPECTIVAS FREQUÊNCIAS SE ENCONTRAM ACIMA DE CADA COLUNA.....	57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- POTENCIAL ANUAL DE GERAÇÃO DE ENERGIA ELÉTRICA A PARTIR DO ÓLEO DE BURITI NO ESTADO DO PARÁ.....	13
TABELA 2 - REAGENTES UTILIZADOS NO TESTE DA DIGESTÃO ENZIMÁTICA APÓS A EXTRAÇÃO DO DNA.....	28
TABELA 3 - AMOSTRAS UTILIZADAS NA QUANTIFICAÇÃO DO DNA DE BURITI.....	29
TABELA 4 - REAGENTES UTILIZADOS NO PREPARO DA BIOTINA.....	31
TABELA 5 - REAGENTES UTILIZADOS NA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DAS SETE SOLUÇÕES NA HIBRIDIZAÇÃO.....	33
TABELA 6 - PARÂMETROS ESPECÍFICOS SELECIONADOS PARA OS DESENHOS DOS PRIMERS SSR NO PROGRAMA STADEN.....	41
TABELA 7 - RELAÇÃO DOS 30 PRIMERS DESENHADOS PARA O TESTE DE VALIDAÇÃO.....	42
TABELA 8 - RELAÇÃO DOS PRIMERS VALIDADOS QUE APRESENTARAM POLIMORFISMO PARA <i>M. FLEXUOSA</i>.....	43
TABELA 9 - ESTIMATIVA DA FREQUÊNCIA ALÉLICA NA POPULAÇÃO 1 (PANDEIROS – VILA).....	54
TABELA 10 - ESTIMATIVA DA FREQUÊNCIA ALÉLICA NA POPULAÇÃO 2 (PANDEIROS – PINDAIBAL).....	55
TABELA 11 - ESTIMATIVAS DE DIVERSIDADE GÊNICA DOS SEIS LOCOS SSR DE <i>M. FLEXUOSA</i> PELA ANÁLISE DE 25 INDIVÍDUOS (POPULAÇÃO 1).....	59
TABELA 12 - ESTIMATIVAS DE DIVERSIDADE GÊNICA DOS SEIS LOCOS SSR DE <i>M. FLEXUOSA</i> PELA ANÁLISE DE 20 INDIVÍDUOS (POPULAÇÃO 2).....	59
TABELA 13 - ESTIMATIVA DO ÍNDICE DE FIXAÇÃO ALÉLICA NA POPULAÇÃO 1 (PANDEIROS – VILA).....	61
TABELA 14 - ESTIMATIVA DO ÍNDICE DE FIXAÇÃO ALÉLICA NA POPULAÇÃO 2 (PANDEIROS – PINDAIBAL).....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	PORCENTAGEM	MSE I	<i>MICROCOCCUS SPECIES</i>
°C	GRAU CELSIUS	NaCl	CLORETO DE SÓDIO
µg	MICROGRAMA	NM	NANÔMETRO
µL	MICROLITRO	PB	PARES DE BASE
µM	MICROMOLAR	PCR	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
λ	LAMBDA	pH	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO
G	GRAMA	RAPD	POLIMORFISMO DE DNA AMPLIFICADO AO ACASO
BEW	TAMPÃO DE LIGAÇÃO E LAVAGEM	RNASE	RIBONUCLEASE
BSA	ALBUMINA DE SORO BOVINA	RPM	ROTAÇÕES POR MINUTO
CIA	CLOROFÓRMIO-ÁLCOOL ISOAMÍLICO	SA	ADAPTADOR CURTO
CTAB	CETIL TRIMETIL-AMONIO BROMETO	SAU 3A	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> 3A
DNA	ÁCIDO DESOXIRIBONUCLÉICO	SDS	DODECIL SULFATO DE SÓDIO
dNTP	DESOXIRIBONUCLEOTÍDEO	SSC	CITRATO SALINO DE SÓDIO
TRIFOSFATO		SSPE	SODIO, SAL, FOSFATO E EDTA
DTT	DITIOTREITOL	SSR	SEQUÊNCIAS SIMPLES REPETIDAS
EDTA	ÁCIDO ETILENO DIAMINO	TAQ	<i>Thermus aquaticus</i>
TETRA-ACÉTICO		T4 DNA LIGASE	TERMINAL TRANSFERASE
H₂O_{BIDEST}	ÁGUA BIDESTILADA	TE	TRIS-EDTA
IPTG	ISOPROPIL-B-	TRIS	TRIS-(HIDROXIMETIL)-AMINOMETANO
DTIOGALACTOPIRANOSIDA		TRIS-Cl	TRIS HCL
KB	KILOBASE	TSP509	<i>Thermus species</i> 509
LA	ADAPTADOR LONGO	U	UNIDADE
LB	MEIO LURIA-BERTANI	UV	RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA
M	MOLAR		
MG	MILIGRAMA		
MgCl₂	CLORETO DE MAGNÉSIO		
MM	MILIMOLAR		
X-GAL	5-BROMO-4-CLORO-3-INDOLIL-B-DGALACTOPIRANOSIDEO		

RESUMO

O buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) é uma palmeira amplamente distribuída no território nacional, ocorrendo desde as veredas do cerrado até os estuários de rios e áreas alagadas da floresta amazônica. A espécie contém importância do ponto de vista natural, ecológico e sócio-econômico, além de alimentício e medicinal, sendo extremamente exploradas por populações locais. O conhecimento acerca da estrutura genética de uma população tem grande aplicação na conservação e no manejo da biodiversidade e pode ser obtido com o uso de marcadores moleculares microssatélites, os quais representam poderosa ferramenta na averiguação de parâmetros genéticos, como diversidade genética, fluxo gênico, deriva, entre outros. Este trabalho teve como objetivo a construção de biblioteca enriquecida com locos microssatélites visando o desenvolvimento e validação de iniciadores (*primers*) para a utilização em futuras análises genéticas do buriti e possível transferibilidade desses marcadores para espécies correlacionadas. Foram desenvolvidos a partir de uma biblioteca genômica enriquecida um total de 160 iniciadores, sendo testados 30, dos quais seis se apresentaram altamente polimórficos. Duas populações com uma distância média de 40 km entre elas, localizadas na APA – Pandeiros, município de Januária, foram avaliadas quanto ao nível de polimorfismo existente em seus indivíduos. Para o estudo da diversidade genética foram avaliadas 44 árvores adultas (24 indivíduos na população 1 – Vila e 20 indivíduos na população 2 – Pindaibal) no total. Estes indivíduos foram analisados utilizando os 6 locos microssatélites polimórficos, avaliados em gel de poliacrilamida a 5% e corados com brometo de etídio. Os resultados indicaram o aparecimento de alelos raros tanto na população 1 quanto na 2 e uma média de 11,5 alelos por loco. Os valores de H_o observados na população 1 tiveram uma média de 0,277 e de $\hat{H}_e = 0,883$, já na população 2 foram encontrados valores de $\hat{H}_o=0,408$ e $\hat{H}_e=0,877$. Os índices de fixação se apresentaram ligeiramente superiores na população 1 (Vila) em relação a população 2. Os resultados encontrados neste estudo fornecem informações importantes que auxiliarão nos futuros estudos da estrutura genética do buriti, podendo ser utilizadas para o planejamento adequado de práticas de manejo sustentável de suas populações, principalmente as exploradas pelas comunidades locais.

Palavras-Chave: *Mauritia flexuosa*, SSR, diversidade genética.

ABSTRACT

The buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) is a single-stemmed palm tree with wide national distribution, occurring from the sidewalks of the savannah to the estuaries of rivers and flooded areas of the amazon forest. The species contains natural, ecological and socioeconomic importance, besides nutritious and medicinal, being extremely explored by local populations. The knowledge concerning the genetic structure of a population has great application in the conservation and in the management of the biodiversity and it can be obtained with the use of microsatélite molecular markers, which represent powerful tool in the verification of genetic parameters, as genetic diversity, gene flow, genetic drift, among others. This work had as objective the construction of library enriched with microsatellite loci seeking the development and validation of *primers* for the use in future genetic analyses of the buriti and possible transference of those markers for correlated species. There were developed, from a enriched genome library a total of 160 *primers*, 30 were tested, of those six were highly polymorphic. Two populations with a medium distance of 40 km between each other, located in APA - Pandeiros, municipal district of Januária, they were evaluated with relationship at the level of existent polymorphism in your individuals. For the study of the genetic diversity there were evaluated 44 adult trees (24 individuals in the population 1 - Vila and 20 individuals in the population 2 - Pindaíbal) in the total. These individuals were analyzed using the six polymorphic microsatelite loci, evaluated in polyacrylamide gel and stained with ethidium bromide. The results indicated the emergence of rare alleles in both populations and an average of 11.5 alleles per locus. The values of H_o observed in population 1 had an average of 0.277 and of $\hat{H}_e = 0.883$, in the population 2, values of $\hat{H}_o=0.408$ and $\hat{H}_e =0.877$ were detected. The fixation index were lighter in population 1 (Vila) in relation to population 2. The results found in this study supply important information and will aid in the futures studies of the genetic structure of the buriti, and could be used for the appropriate planning of practices of population sustainable management, especially of those which are explored by the local communities.

Keywords: *Mauritia flexuosa*, SSR, gentic diversity.

1. INTRODUÇÃO

Nos trópicos, nas localidades mais inacessíveis, as populações que residem em florestas limpam áreas para sua moradia, cultivo e colheita de produtos florestais não madeireiros (NTFPs) nas próprias florestas. Consequentemente a conservação de recursos genéticos envolve, necessariamente, o manejo desses recursos no contexto do uso humano (Ratnam & Boyle, 2000).

A preocupação com as consequências da degradação dos diversos ecossistemas vem sendo objeto de discussões e estudos nos últimos anos, tanto por parte de instituições governamentais, quanto pela comunidade científica (Telles, 2000).

Populações de vida selvagem no século XXI são deparadas com muitas ameaças antropogênicas. Mudanças climáticas, fragmentação e perda de habitat, perturbação, poluição, competição de espécies invasoras, utilização demasiada do solo e patógenos tudo constituem riscos de extinção e principais desafios para condução evolucionária da vida selvagem sustentável (Ashley *et al.*, 2003). A taxa anual comum de perda de populações de planta e habitats calculadas estão próximas de 1% (Balmford *et al.* 2003).

A redução das florestas e a fragmentação florestal são duas das principais ameaças às populações naturais de espécies arbóreas tropicais (Heywood *et al.*, 1994; Young e Boyle, 2002). Vários estudos detectaram que a redução do habitat natural e subsequente isolamento espacial das populações têm consequências negativas sob o sucesso reprodutivo e o fluxo gênico das espécies arbóreas tropicais (McCauley, 1995; Nason e Hamrick, 1997; Seoane *et al.*, 2000). Isto pode levar à redução da variabilidade genética e ao aumento de efeitos deletérios da endogamia nas progêniens, resultante na depressão por endogamia (Charlesworth e Charlesworth, 1987; Ellstrand, 1992; Ellstrand e Ellan, 1993). Estudos de genética de populações indicam que as progêniens de populações fragmentadas são as mais propensas a terem sido geradas por autofecundação ou polinizadas por poucos indivíduos (Hall *et al.*, 1996; Aldrich e Hamrick, 1998; Seoane *et al.*, 2000; Cascante *et al.*, 2002; Fuchs *et al.*, 2003). O cruzamento entre indivíduos parentes e autofecundações causa redução na heterozigosidade e aumento na expressão de alelos recessivos deletérios.

A fragmentação florestal leva à redução do tamanho populacional, criando gargalos genéticos (“bottlenecks”), pois os indivíduos que restam contêm apenas uma pequena amostra do conjunto gênico original. Quando se têm poucas gerações, os resultados observados se devem ao efeito de gargalo genético (Young *et al.*, 2000), mas a pequena população remanescente, caso permaneça isolada por muitas gerações, terá contínua perda de alelos

devido à deriva genética aleatória, diminuindo a variabilidade dentro de populações e aumentando a diferenciação entre populações (Barret & Kohn, 1991; Seoane *et al.*, 2000).

Poucas são as espécies estudadas do ponto de vista genético, sendo este tipo de estudo indispensável à conservação dos recursos da floresta tropical. Devido a restrições ao estudo de um grande número de espécies, tem-se procurado amostrar aquelas que o representem ou que sirvam de modelo para representar determinados biomas (Kageyama *et al.* 2003) ou até mesmo determinado ecossistema (*ex.* veredas - formações vegetais) dentro de um bioma. Neste contexto encontram-se as palmeiras, com espécies, de importância social e econômica pouco estudada.

Existe no Brasil uma grande variedade de palmeiras que, se devidamente exploradas, poderão desempenhar no futuro um papel destacado na economia nacional pelo valor e diversidade de seus produtos (Silva *et al.*, 1986).

Entre as palmeiras mais utilizadas a *Mauritia flexuosa* L. f. conhecida popularmente como buriti, é encontrada no seu estado silvestre em várias formações vegetais, principalmente em áreas de inundação permanente ou periódica, em agrupamentos mais ou menos homogêneos, sobre solos hidromórficos, formando populações quase monoespecíficas, às quais se dá o nome de miritizais ou buritizais (Storti, 1993; De Paula Fernandes, 2001).

O buriti é uma palmeira amplamente distribuída no território nacional, ocorrendo desde as veredas do cerrado até os estuários de rios e áreas alagadas da floresta amazônica (Pott, 2004). Buriti é um nome derivado do tupi-guarani e significa “o que contém água”. A planta cresce dentro das veredas, áreas permanentemente úmidas no cerrado, com palmeiras e arbustos espalhados (Ribeiro & Walter, 1998).

Nas regiões onde se encontra, o buriti é a planta mais importante, de onde o homem local aprendeu a retirar parte essencial do seu sustento. Por isso é considerada pelos nativos como a Árvore da Vida ("life tree"), pois dela tudo se aproveita, servindo como alimento, remédio e material para a construção de casas, utensílios domésticos e também utilizados para artesanato. Mais recentemente descobriu-se que o óleo de buriti tem a capacidade de filtrar e absorver raios ultravioletas podendo, portanto, evitar o surgimento de câncer de pele (Pott, 2004).

O processo contínuo da destruição do buriti (*M. flexuosa*) como matéria prima no artesanato, queimadas e construções de novos bairros, resultam na degradação da espécie. Traça-se um panorama que ameaça desaparecer por não ser valorizado e preservado como deveria: a plasticidade do buriti e do seu uso popular tradicional. (Fearnside & Ferraz, 1995).

No entanto, esta espécie ainda continua pouco conhecida com relação a estudos que viabilizem o manejo de suas populações (Cavalcante, 1991; De Paula Fernandes, 2001). Já o estudo genético destas populações depende de ferramentas como marcadores moleculares que devidamente desenvolvidos, poderão influenciar na conservação, manejo e manutenção, evitando assim a sua extinção (Pinto; Souza e Carvalho, 2004).

Para a definição de programas de manejo eficientes, fatores genéticos como perda da heterozigosidade, variação no índice de fixação e tamanho efetivo populacional devem ser considerados em conjunto com os dados dendrométricos. Para estudos genéticos nesse nível, os marcadores moleculares como microssatélites têm sido intensamente utilizados, pois são uma ferramenta muito eficiente no estudo de estrutura genética de populações, fluxo gênico, paternidade, viabilidade populacional e na definição dos efeitos de fragmentação, sendo úteis nas definições de estratégias de conservação (Collevatti, *et al.*, 1999).

Finalmente, os dados moleculares podem ser utilizados para melhor compreender a dinâmica dos alelos nas populações de uma determinada espécie, fornecendo subsídios para o maior entendimento dos processos microevolutivos que estão atuando na diferenciação destas populações (Reis, 1996; Avise, 2000).

2. JUSTIFICATIVA

No Norte do Estado de Minas Gerais, as populações tradicionais exploram a diversidade da flora nativa, principalmente como fonte alimentar e medicinal. Deste modo, a região, caracterizada pela baixa renda destas famílias, demanda, com urgência, a obtenção de informações sobre sua biodiversidade e utilização sustentável dessa flora. Dentre as espécies utilizadas, o buriti fornece vários produtos economicamente importantes para as famílias de baixa renda.

Até o presente momento, os fatores genéticos não são considerados em qualquer atividade, extrativista ou não. Sabe-se que tais fatores, além do ambiente, são responsáveis por diferenças em produtividade, adaptação e reprodução entre indivíduos. Antes que a espécie possa perder genes importantes para sua perpetuação, é imprescindível o conhecimento da estrutura genética. Com os resultados obtidos nesse trabalho espera-se a obtenção de informações que possam contribuir para o desenvolvimento de ferramentas úteis a futuras análises genéticas da espécie e assim o uso sustentável.

Este trabalho foi elaborado em âmbito regional para áreas de abrangência da Bacia do Rio São Francisco no Estado de Minas Gerais, e mais especificamente no médio São

Francisco, na área de abrangência da bacia do rio Pandeiros localizada na região Norte do Estado de Minas Gerais e envolve a Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) e financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Para este trabalho foi proposto o desenvolvimento de marcadores microssatélites a partir de uma biblioteca genômica enriquecida para o dinucleotídeo AG/TC do genoma de *Mauritia flexuosa*, espécie de grande importância econômica para a região. Após a conclusão de todas as etapas do trabalho, os *primers* microssatélites contribuirão para futuros estudos de diversidade genética da espécie, a qual poderá melhor ser avaliada quanto a sua conservação.

Isto decorre da importância da utilização do buriti, contribuindo para a sustentabilidade de atividades econômicas, como a agricultura familiar de caráter eminentemente extrativista, bem como para as atividades industriais a que o buriti se destina.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo construir uma biblioteca genômica enriquecida para sequências microssatélites para a espécie *M. flexuosa* de modo a gerar uma ferramenta para estudos de genética de populações, visando fornecer subsídios aos programas de manejo sustentável da espécie que é intensamente explorada pelas comunidades rurais.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Isolar e sequenciar regiões microssatélites do genoma de buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.);
- ✓ Desenhar *primers* específicos visando à amplificação dos locos de microssatélites isolados e selecionados;
- ✓ Otimizar os *primers* desenhados;
- ✓ Caracterizar cada loco de microssatélite com relação ao tipo de repetição, número e tamanho de alelos amplificados para futuros estudos de diversidade genética da espécie;
- ✓ Testar a transferibilidade dos marcadores SSR entre espécies da mesma família: de buriti (*M. flexuosa*) para babaçu (*Orbignya oleifera*).

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. Origem e Diversidade Genética em Plantas

Embora as plantas com flores (Angiospermae) tenham sido originadas provavelmente no período Jurássico (145 a 206 milhões de anos atrás), a maior parte da diversificação e dominância destas na Terra tem sido atribuída ao período Cretáceo (90 a 140 milhões de anos atrás) (Crane *et al.*, 1995).

A diversidade biológica ou biodiversidade é frequentemente relacionada com a diversidade de espécies, embora apresente um profundo relacionamento ecológico e evolucionário (Falk, 1990). De fato, biodiversidade é a variabilidade apresentada pelos organismos vivos, dentro de espécies, entre espécies e ecossistemas (Unep, 1992). Consequentemente é a variação que ocorre sob três enfoques: genes, espécies e ecossistemas (McNeely *et al.*, 1990). Assim, diversidade genética é o somatório da informação genética existente nos organismos que constituem a flora, a fauna e a microbiota que, se adequadamente identificada e capturada, passa a constituir os recursos genéticos, fonte da variação genética disponível ou variabilidade genética (Vilela-Morales e Valois, 2000).

Em relação ao potencial oferecido pela biodiversidade, o Brasil é um dos poucos países do mundo que possuem altos níveis de diversidade biológica ou megadiversidade, e como efeito da diversidade apresentada pelos seus diferentes biomas e ecossistemas ao longo do seu território. Em número de espécies, Mcneely *et al.* (1990) consideram os seguintes valores: (a) 55.000 de plantas superiores, com destaque para palmeiras; (b) 3.010 de vertebrados terrestres; 428 de mamíferos; 516 de anfíbios; 467 de répteis; 1.622 de aves e 3.000 de peixes de água doce; e (c) 10 a 15 milhões de insetos, muitos deles de famílias ainda não descritas. Isto tudo sem contar com o enorme potencial oferecido pela microbiota que poderá constituir fonte de recursos genéticos de valor inestimável.

4.2. Efeitos genéticos do extrativismo

Atualmente, no Brasil, existe um número extenso de variedades de palmeiras que, se exploradas adequadamente, poderão desempenhar no futuro um papel destacado na economia nacional pelo valor e diversidade de seus produtos, destacando-se, dentre elas, o buriti (Silva *et al.*, 1986).

Apesar da abundância de buriti na maior parte do território brasileiro (Henderson *et al.* 1995) e o intenso uso de muitas partes dessa palmeira para alimentação, extração de óleo, cobertura, e habilidades manuais (Balick, 1986; Castro, 2000), poucos estudos focalizaram na

ecologia de espécies (Cardoso *et al.* 2002; Ponce Calderón 2002; Ponce *et al.* 1999) e não foram avaliados os efeitos de colheita em populações de buriti previamente avaliadas.

Os efeitos de colheita de produtos florestais não madeireiros podem ser avaliados comparando a sobrevivência, crescimento, e taxa de reprodução de indivíduos propensos a intensidades diferentes na extração de produtos (Kathriarachchi *et al.* 2004; Uma Shaanker *et al.* 2002). Mudanças nestas taxas podem afetar a estrutura das populações. Foram feitas comparações de estrutura entre populações propensas a intensidades diferentes de extração e podem revelar com o passar do tempo potenciais impactos (Murali *et al.* 1996).

Uma redução drástica no tamanho das populações, através do corte seletivo, pode levar à deriva genética caracterizada pela perda e fixação aleatória de alelos, aumento do parentesco e endogamia dentro das populações (Futuyma, 1992), colocando em risco a sustentabilidade do manejo. Considera-se que, a extração de folhas maduras aumenta a mortalidade, reduz o crescimento e a taxa reprodutiva em algumas espécies de palmeiras (Endress *et al.* 2004; Ratsirarson *et al.* 1996).

O extrativismo resulta em pressões diretas e indiretas nas populações, devido à competição entre humanos e animais por recursos. Embora animais mostrem diferentes habilidades para resistir às pressões, de acordo com o grupo taxonômico, aqueles que tendem a ser mais fortemente afetados pela caça e outras atividades humanas incluem os mais importantes predadores e dispersores de sementes. A redução ou remoção das populações animais podem rapidamente influenciar características tais como composição e estrutura da vegetação. Finalmente, o extrativismo pode afetar a diversidade genética das populações exploradas, especialmente quando da extração de flores e frutos que mostram diferentes características, resultando em diferentes graus de pressão (Peters *et al.*, 1989).

4.3. Conservação de Espécies Arbóreas Tropicais

As florestas brasileiras são consideradas entre as de maior biodiversidade do mundo. Segundo as proposições na 8^a Conferências das Partes (COP-8), no Brasil, encontram-se de 15% a 20% do total de espécies do planeta. A diversidade da flora brasileira é representada por mais de 55 mil espécies descritas (Implementação, 2006).

No entanto, Barreto e colaboradores (2005) relatam que 11% da Floresta Amazônica, que se estende por 4,1 milhões de km², já se encontrava desmatada. Ainda assim, a intensidade de destruição tem se acirrado nos últimos anos, atingindo a taxa de 2 milhões de hectares anuais. No cerrado, dos 204 milhões de hectares originais do bioma, estima-se que 57% tenham sido completamente destruídos, com a metade do remanescente já

descaracterizada e com a biodiversidade comprometida. A taxa de desmatamento nesse bioma chega a 3 milhões de hectares ao ano, tendo como principal motivo a exploração da vegetação para produção de carvão vegetal e a abertura de áreas para a agropecuária (Cerrado, 2004).

A redução no tamanho dos fragmentos e o seu isolamento em forma de ilhas desencadeiam alguns processos ecológicos e genéticos populacionais com consequências potencialmente desastrosas. Do ponto de vista genético, isso leva à redução no número efetivo de indivíduos da população, reduz a densidade de indivíduos reprodutivos, aumenta a distância entre coespecíficos reprodutivos e, com isso, aumenta a taxa de autofecundação e o risco de perda de alelos em decorrência da homozigose e da deriva genética (processo estocástico, atuante sobre as populações, modificando a frequência dos alelos e a predominância de certas características na população) (Hall *et al.*, 1996; Sebbenn *et al.*, 2001; Cascante *et al.*, 2002; Srikwan; Woodruff *et al.*, 2003; Fuchs *et al.*, 2003; Lowe *et al.*, 2005). Desse modo, os efeitos negativos da endogamia incidem diretamente sobre o valor adaptativo da espécie (Charlesworth & Charlesworth, 1987), que podem ser evidenciados quanto à quantidade de pólen, número de óvulos, quantidade de sementes, proporção de germinação e crescimento e capacidade competitiva (Frankham *et al.*, 2002). O resultado disso é conhecido, também, como “erosão genética”, que é caracterizada pela perda de alelos e, consequentemente, da variabilidade genética e da capacidade das espécies de reagir às múltiplas pressões ambientais para sobreviver e continuar gerando descendentes viáveis (Tarazi, 2007).

Com a fragmentação das formações florestais, decresce o número de espécies remanescentes, à medida que se reduz o tamanho dos fragmentos (Harris, 1984), caracterizando o que se poderia considerar como extinções locais dessas espécies. Quanto menores e mais isoladas forem às populações remanescentes, maiores são os riscos de sua extinção (Holsinger, 2003). Em contraste, altos níveis de fluxo gênico entre populações fragmentadas foram propostos como um atenuante para a perda de diversidade genética por deriva genética, tendo como resultado populações fragmentadas que preservam uma alta proporção da variabilidade genética das populações originais (White *et al.*, 1999).

A conservação da biodiversidade depende da disponibilidade de ecossistemas funcionais que, por sua vez, requerem diversidade de espécies, cada uma com funções distintas e indispensáveis no ecossistema. Cada espécie deve estar representada por populações viáveis e isso depende da existência de ampla variabilidade genética que possibilite ajustes às mudanças ambientais ao longo das gerações (Shimizu, 2007).

Na conservação da variação genética duas ações podem ser enfatizadas: (i) conservação da diversidade genética *in situ* (variação genética potencial), por meio de

reservas genéticas isoladas ou preferencialmente localizadas dentro de unidades de conservação ambiental, como parques, reservas, santuários, refúgios etc.; e (ii) conservação da variabilidade genética *ex situ* (variação genética capturada ou disponível), em coleções de recursos genéticos localizadas em jardins botânicos, arboretos, zoológicos e bancos de germoplasma (Vilela-Morales e Valois, 2000).

4.4. A espécie *Mauritia flexuosa*

4.4.1. Aspectos taxonômicos e botânicos

Estas palmeiras estão incluídas em uma das maiores famílias (Arecaceae) de plantas (Ribeiro *et al.*, 1999). De um modo geral, têm um alto valor econômico, ornamental e seu estudo tem despertado o interesse de pesquisadores pelas peculiaridades que está família apresenta (Fonseca & Silva, 1998). A família Arecaceae é composta de 200 gêneros, distribuídos em seis subfamílias: I. Coryphoideae (39 gêneros), II. Phytaloideae (3 gêneros), III. Nypoideae (1 gênero), IV. Ceroxyloideae (11 gêneros), V. Arecoideae (124 gêneros) e VI. Calamoideae (22 gêneros) (Uhl & Dransfield, 1988).

A espécie *Mauritia flexuosa* pertencente à família Arecaceae, subfamília Calamoideae, e apresenta diversos nomes populares: miriti, moriti, muriti, boriti, buriti, coqueiro-buriti, carandá-guaçu, carandaí-guaçu ou palmeira-dos-brejos. É uma palmeira robusta e elegante de 20-30 m de altura, com tronco (estipe) solitário e ereto, sem ramificação, cor cinza quase branco, liso e com anéis uniformemente espaçados, de 30-60 cm de diâmetro, com uma grande massa de raízes na base e pneumatóforos visíveis. No ápice do estipe encontra-se uma coroa de 20 folhas de até 4 m de comprimento (Figura 1). É uma planta dióica ou polígamodióica, ou seja, existem indivíduos com flores masculinas e indivíduos com flores femininas e hermafroditas. O fruto é uma drupa globoso-alongada de 4-7 cm de comprimento, constituída de epicarpo (casca mais externa) formado de escamas rombóides de cor castanho-avermelhada; mesocarpo (parte comestível) representado por uma massa espessa de cor alaranjada; endocarpo esponjoso que envolve a semente muito dura. Uma única planta pode conter até 7 cachos de frutos, com uma média anual de produção de 5000 frutos (Pott, 2004). Há normalmente uma semente por fruto, podendo ocorrer casos de duas de forma geralmente sub-globosa; endosperma homogêneo; embrião basal; germinação adjacente ligular (Ferreira, 2006). O gênero *Mauritia* caracteriza-se pelo porte arbóreo e está incluído entre as palmeiras mais altas do Brasil. Possui espáclides axilares grandes, pendentes com numerosas aspas sobre o eixo das ramificações (Reitz, 1974).

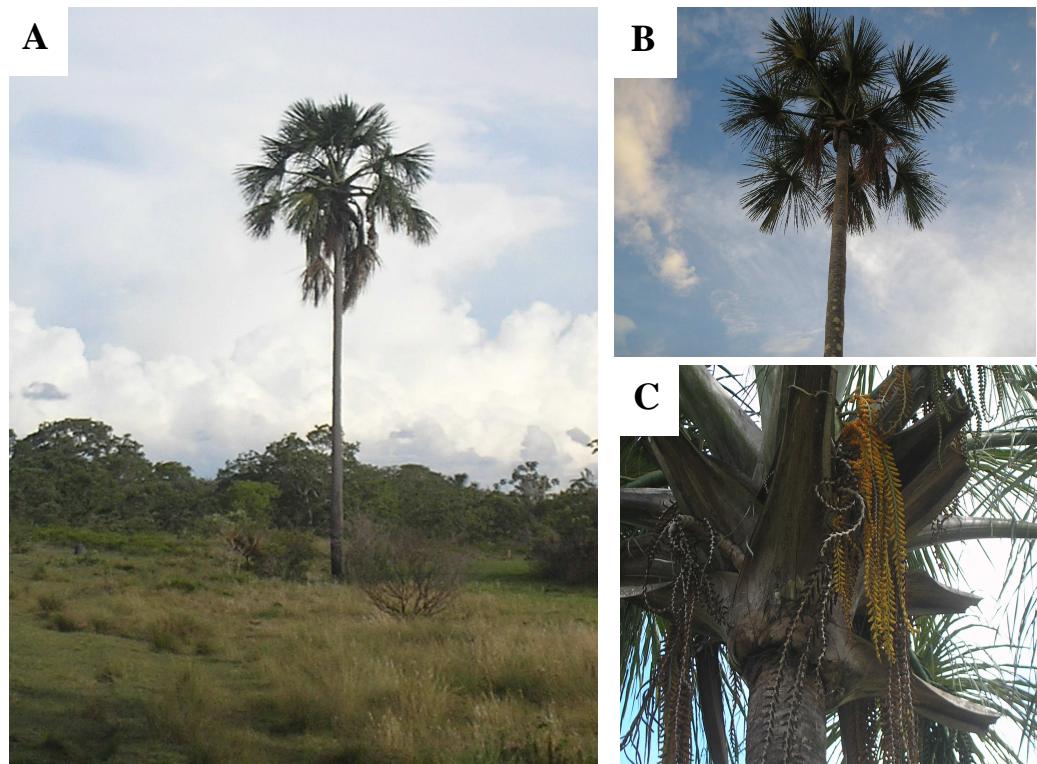


Figura 1 – (A) Árvore de *Mauritia flexuosa* na APA Pandeiros; **(B)** Vista da região abaxial das folhas da palmeira; **(C)** Cacho de flores maduros e secos.

Na literatura há divergências quanto à espécie do buriti, ora considerada como *Mauritia flexuosa*, ora como *Mauritia vinifera*. Segundo Rizzini & Mors (1995), *Mauritia vinifera* e *Mauritia flexuosa* são espécies diferentes com áreas de ocorrência também diferentes: a primeira ocorre nos pontos mais úmidos do cerrado e a segunda na Amazônia. Mas Duke, citado por Rizzini & Mors (1995), considerou ambas como formas diferentes da mesma espécie, e esta opinião está atualmente aceita (Uhl & Dransfield, 1998; Padoch, 1988; Kahn, 1990; Henderson *et al.*, 1991; Henderson, 1995; Storti, 1993).

Apesar de todo o conhecimento que se tem sobre sua sistemática, ecologia, usos e potencial econômico, pouco foi investido em trabalhos que abordassem as características agronômicas de *M. flexuosa*, como, por exemplo, o estudo de sua variabilidade genética, métodos de propagação, definição de espaçamento e adaptação a diferentes tipos de solos, início da produção, principais pragas e doenças, produtividade, tecnologias de armazenamento e processamento (Ferreira, 2006). Fao (1983), além de fazer um balanço sobre a situação da espécie em relação à pesquisa e desenvolvimento, propôs linhas de ações a serem implementadas com o objetivo de superar estas deficiências, garantindo um futuro promissor para a espécie tanto no aspecto da sua conservação, quanto econômico.

4.4.2. Distribuição geográfica do buriti

O buriti (*Mauritia flexuosa*) é uma palmeira de grande porte que forma populações oligárquicas, os “buritizais”, e possui uma distribuição natural muito ampla, sendo uma espécie restrita à América do Sul (Cavalcante, 1991; De Paula Fernandes, 2001). Sua ocorrência já foi registrada na Bolívia (Beni, Santa Cruz), Colômbia, Equador, Guiana, Peru (Loreto, Madre de Dios), Suriname, Trinidad (Caribe), Venezuela e Brasil (Acre, Amazonas, Rondônia, Mato Grosso, Goiás, Pará, Minas Gerais, São Paulo, Piauí e Maranhão) (Ferreira *et al.*, 2005).

O buriti ocorre em toda a Amazônia, Nordeste, Centro Oeste e Brasil Central, atingindo seu limite austral no norte do Estado de São Paulo. É a palmeira mais amplamente distribuída no país, formando populações naturais homogêneas tão amplas que chega a ser detectada por imagens de satélite. São famosos os "buritizais" das ilhas do estuário do Baixo Tocantins no Pará, ou as veredas ao longo de córregos no oeste da Bahia. Na Região dos cerrados, ele aparece nas regiões baixas e úmidas, denominadas popularmente por veredas (Pott, 2004).

As veredas são formações fitogeográficas contornadas pelo cerrado, situados em numerosos pontos quase sempre bastante isolados entre si ou separados por vários quilômetros. Constituem uma importante fitofisionomia do Cerrado, pelo significado ecológico, sócio-econômico e estético-paisagístico que lhes conferem um grande valor regional, principalmente por serem refúgios fauno-florísticos e ambientes de nascedouros das fontes hídricas (Ferreira, 2003). Seus maciços ocupam as suaves depressões dos terrenos cujas áreas possuem grande umidade permanente, sendo muitas vezes pantanosas, encharcadas, com pequenos cursos d’água e não raro com nascentes de água que formam cursos. Outro fator que contribui para o seu aspecto é o solo rico em húmus, com intensa umidade ao longo do ano (Castro, 1980; Brandão *et al.*, 1992).

Normalmente sua ocorrência está associada às áreas periódica ou permanentemente inundadas ou com drenagem deficiente, às vezes próxima a rios, ao longo de florestas de galerias e savanas (Brasil central e Venezuela). Padoch (1985) cita um estudo (Onern, 1976) que estima em 1.900.000 ha de áreas pantanosas nas cercanias de Iquitos, no Peru, com 80% das árvores sendo representada por *M. flexuosa* e *Euterpe precatoria*.

Ocorre exclusivamente em áreas alagadas ou brejosas, como em beira de rios, igapós, lagos e igarapés, onde é geralmente encontrado em grandes concentrações. Segundo Ramirez e Brito (1990), os buritizais definem as áreas tropicais brejosas, já que diferem facilmente da vegetação de cerrado que os cerca. Nesta espécie, a sua distribuição tem ligação com locais úmidos, pois, parte do seu tronco fica imersa em água por longos períodos, sem que isso lhe

cause dano (Miranda *et al.*, 2001; Valente & Almeida, 2001). Á água tem importante papel na disseminação de suas sementes. É até possível encontrá-lo em solo seco, contudo, em alguma época este local foi muito úmido ou encharcado. Para cultivá-lo em terreno seco deve receber muita água na sua fase juvenil (Pott, 2004).

Todavia, esta palmeira ocorre nas veredas (Figura 2), tanto em alinhamentos como em formações e associações mais densas que se destacam no meio dos cerrados adjacentes (Castro, 1980). As veredas são ambientes de grande importância no domínio do cerrado, sendo responsáveis pela perenidade e regularidade dos rios, e funcionando também como locais para pouso de aves, onde estas pernoitam, descansam, alimentam-se e reproduzem-se. São locais de fonte de alimento e de reprodução também para outros elementos da fauna terrestre e aquática. Estes ambientes são muito sensíveis às alterações ambientais e foram considerados ecossistemas de conservação permanente em 13/12/1986, pelo governo do estado de Minas Gerais (Brandão *et al.*, 1992) e também pelo Ato Declaratório Ambiental do IBAMA, em seu anexo I, artigo 2º do Código Florestal (IBAMA, 1988).

Em estudos sobre a resistência de plantas jovens à deficiência de água em *M. flexuosa*, Calbo & Moraes (1997) verificaram que esta espécie possui mecanismos para tolerar um estresse moderado de falta de água.



Figura 2 – Vereda da Área de Proteção Ambiental (APA) - Pandeiros com visão dos buritis (*Mauritia flexuosa*).

4.4.3. Utilização do buriti

Inúmeros produtos úteis do buritizeiro são aproveitados pelas populações ribeirinhas de sua região de ocorrência, tanto na sua alimentação como em outras necessidades diárias, destacando, dentre elas, a produção de bebida natural ou fermentada, sabão caseiro, material para enfeite e construção de casas, óleo e doces dos frutos (Pott, 2004).

Usos como os de folhas para cobertura de habitações rústicas; frutos para elaboração de bebidas, fermentadas ou não, doces, sorvetes, sucos e geléias; fibras da epiderme das folhas novas para confecção de tecidos, cordas, redes, chapéus, bolsas e na extração de óleo rico em vitamina A (Pittier, 1926; Braga, 1960; Dugand, 1961; Moses, 1962; Braun, 1968; Schultes, 1977; Hoyos & Braun, 1984; Padoch *et al.*, 1985; Braun & Chitty, 1987; Padoch, 1988; Cavalcante, 1991; Henderson, Beck & Scariot, 1991; Galeano, 1991; Almeida & Silva, 1994; Miranda *et al.*, 2001).

A seiva do tronco do buriti é tão rica em açúcar que é possível extrair da mesma a sacarose cristalizada como da cana-de-açúcar. Para a sua obtenção, faz-se um furo no tronco e recolhe-se a seiva num recipiente, produzindo em média 8-10 litros por árvore. Cavalcante (1991), citando Pesce (1941), afirma que é possível obter açúcar (97% sacarose) da seiva do tronco, depois de submetê-la ao mesmo processo adotado na extração de açúcar de cana. Aproveitamentos mais "exóticos" estão relacionados com a cultura indígena Sul-Americana. Galenano (1991) e Hoyos & Braun (1984) citam o uso de estipes de plantas mortas como criatórios de larvas de coleópteros da família dos Curculionidae, ricos em gordura e como complemento da dieta protéica de indígenas na Venezuela e Colômbia. Devez (1932), em estudo realizado na Guiana Francesa, identificou o uso do endocarpo para confecção de botões, em processo similar ao realizado com o de Jarina (*Phytelephas macrocarpa*). Finalmente, a extração de um tipo de "amido" da medula do estipe para fabricação de pão por tribos indígenas na Venezuela é citada em Hoyos & Braun (1984). Estudos indicam que apenas as plantas do sexo masculino (que não dão frutos) do buriti que possuem seiva açucarada (Ferreira *et al.*, 2005).

A madeira do buritizeiro é moderadamente pesada e dura, porém de baixa durabilidade natural. Mesmo assim é muito utilizada regionalmente em construções rurais e construção de trapiches em beira de rios. A árvore é uma das palmeiras mais ornamentais da nossa flora, contudo, pouco utilizada por paisagistas. O único que ousou usá-la pela primeira vez foi o famoso paisagista Roberto Burle Marx nos jardins do Palácio Itamarati em Brasília (Ferreira *et al.*, 2005).

O óleo de buriti também apresenta um bom potencial para a geração de energia elétrica. Em cada hectare podem ser encontradas de 200 a 500 buritizeiros (Brasmazon, 1998). Considerando que cada palmeira de buriti produz cinco cachos, com 650 frutos por cacho em média por ano, tem-se uma produção anual de 21 a 54 toneladas de frutos frescos por hectare.

Admitindo-se as produtividades mencionadas do óleo de buriti, o potencial anual por hectare colhido para a geração de energia elétrica a partir desse óleo pode variar de 0,9 a 8,0 MWh (Tabela 1).

Tabela 1 – Potencial anual de geração de energia elétrica a partir do óleo de buriti no estado do Pará. **Fonte:** Silvia, M. V. M, 2005.

TIPOS DE ÓLEO	EFICIÊNCIA NA GERAÇÃO DE ENERGIA (MWh) - 25%	EFICIÊNCIA NA GERAÇÃO DE ENERGIA (MWh) - 30%
IN NATURA		
Produtividade 0,34 t/ha	0,9	1,1
Produtividade 2,43 t/ha	6,5	7,8
TRANSFERIFICADO		
Produtividade 0,34 t/ha	0,9	1,1
Produtividade 2,43 t/ha	6,7	8,0

O buriti possui importância estratégica na preservação da fauna de várias espécies de vertebrados e invertebrados que se alimentam ou que se reproduzem em suas folhas, estipe (caule), raízes, folhas e frutos. Muitas dessas espécies não se alimentam de outras plantas, dependendo do buriti para sobreviver (Valente & Almeida, 2001).

A importância do buriti transcende a sua utilidade econômica, tornando-se uma das plantas mais estimadas pelas populações de muitas regiões do país, sentimento este traduzido pelo uso de seu nome para designar várias cidades no interior do país: Buritizal (SP), Buriti (MA), Buritis (MG), Buriti Alegre (GO), Buriti Bravo (MA), Buritama (SP), Buriti dos Lopes (PI), Buritirama (BA), Buritizeiro (MG) (Pott, 2004).

4.5. Estrutura Genética de Populações de Plantas

Uma população, do ponto de vista genético, é definida como um conjunto de indivíduos de uma mesma espécie, que compartilham o mesmo *pool* gênico, isto é, indivíduos que compartilham seus genes através de reprodução (Falconer & Mackay, 1989).

As plantas, diferentemente dos animais, são fixas, vivem em ambientes heterogêneos e, portanto, apresentam uma maior plasticidade fenotípica na resposta às adversidades ambientais. Ao longo do tempo, forças evolutivas, como aquelas resultantes da presença de

metais pesados no solo, promovem modificações na constituição genética das populações naturais, no sentido de se promover um aumento do valor adaptativo dessas populações. A seleção natural atua sobre essas mudanças favorecendo indivíduos que apresentam maior valor adaptativo. Modificações genéticas que não afetam o valor adaptativo podem, no entanto, ser acumuladas e virem a se fixar, diferenciando as populações geneticamente, sem que essa diferença se expresse fenotipicamente. Desse modo, se ocorre uma alteração nas condições ambientais ou genéticas que favoreçam organismos mutantes, eles passam a ser fenotipicamente superiores, mudando o caminho evolutivo dessas populações (Coelho & Valva, 2001).

O desenvolvimento e a manutenção da estrutura genética ocorrem devido às interações de um conjunto complexo de fatores evolutivos, como variação no conjunto gênico, organização desta variação dentro de genótipos, distribuição espacial dos genótipos, sistema de reprodução que controla a união dos gametas para a formação das progêniens, seleção, deriva, mutação, eventos casuais e processos de crescimento, mortalidade e reposição dos indivíduos que darão origem às populações futuras (Hamrick, 1989).

O conhecimento da estrutura populacional é importante para se evitar perdas adicionais de diversidade genética em populações que são ameaçadas por atividades madeireiras, desmatamento e fragmentação de hábitat. A fragmentação de áreas de floresta, pelo avanço da agricultura e de outras atividades antrópicas, leva ao isolamento de subpopulações e, consequentemente, à deriva genética e à endogamia (Hall *et al.* 1996, Nason *et al.* 1997).

As informações sobre a variabilidade genética em populações naturais são fundamentais para o progresso de duas áreas de grande interesse atual: especiação em florestas tropicais e conservação de recursos genéticos (Buckley *et al.* 1988).

Os parâmetros descritivos para avaliar a estrutura genética de uma população são as frequências alélicas e genotípicas, que se referem, respectivamente, à quantidade observada de um determinado alelo frente ao total de alelos da população e a quantidade observada de indivíduos com um determinado genótipo frente ao total de indivíduos da população. As heterozigosidades esperada (H_e) e observada (H_o) são as medidas da variabilidade genética da população, que permitem identificar o número de indivíduos heterozigotos, bem como a quantidade de indivíduos homozigotos diferentes. O número de alelos por loco e a percentagem de locos polimórficos tem sido empregados como índice de diversidade em populações naturais, no sentido de caracterizar e comparar os níveis de variação genética nestas populações (Weir, 1996).

Forças evolutivas tais como: mutação, migração, seleção e deriva genética atuam dentro do contexto de cada espécie influenciando a estrutura genética da população, ou seja,

interferindo na distribuição heterogênea (não aleatória) dos alelos e genótipos no espaço e tempo (Hamrick, 1992).

As populações de plantas não têm seus genótipos arranjados aleatoriamente, mas sim estão estruturadas no espaço e no tempo. A estrutura espacial refere-se à distribuição espacial dos indivíduos, sendo característica de cada espécie e determinada principalmente pelo sistema de reprodução e pelos padrões de dispersão do pólen, sementes ou outros propágulos. Já, a estrutura genética temporal refere-se à subdivisão de gerações, por exemplo, entre pais e filhos, plântulas e jovens, jovens e adultos, ou ainda, pode referir-se às diversas gerações contidas em um banco de sementes ou de germoplasma (Hamrick, 1989).

Nesse sentido, o estudo da diversidade e da estrutura genética em populações arbóreas é importante para que se entenda como esta diversidade é distribuída e quais as características do ambiente ou da espécie que influenciam essa distribuição. Nestes estudos, a principal ferramenta que alavancou o estudo da genética de populações, possibilitando a caracterização da estrutura genética entre e dentro de populações é o uso de marcadores moleculares (Sebbenn, 2001).

4.6. Marcadores Moleculares para Análise Genética

O conhecimento a respeito da genética iniciou-se com os trabalhos de Mendel em 1865. Trabalhando com as ervilhas, Mendel postulou a existência de fatores, hoje conhecidos como genes, que controlavam a manifestação de determinadas características. Ao cruzar plantas puras e contrastantes para cor das sementes, Mendel concluiu que as plantas heterozigotas (F_1) produzem dois gametas distintos na mesma proporção e que ambos segregam para a formação dos zigotos. Neste caso, $\frac{1}{4}$ dos indivíduos da geração F_2 é igual ao fenótipo de um dos genitores, $\frac{1}{2}$ dos indivíduos são iguais à geração F_1 e $\frac{1}{4}$ é igual ao outro genitor, resultando no que se conhece como primeira lei de Mendel.

Mendel ainda realizou experimentos para descobrir como a forma e a cor da semente era herdada em conjunto, concluindo que cada genitor possuía duas cópias de um gene, e que transmitia cada uma das cópias para seus descendentes de forma independente. Desse modo, elaborou a segunda lei da herança que é a lei da segregação independente, a qual postula que durante a formação dos gametas, a segregação de um par de genes ocorre de forma independente do outro par.

Com a redescoberta dos trabalhos de Mendel, no final do século XIX, por Hugo de Vries, Carl Correns e Erick von Tschermak-Seysenegg, posteriormente realizaram-se inúmeras pesquisas a fim de esclarecer os mecanismos básicos da herança. Esses trabalhos

culminaram na formulação da Teoria Cromossômica da Herança por W. Sutton e T. Boveri, em 1902, que estabeleceram a relação entre cromossomos e fatores mendelianos (genes), segundo a qual os cromossomos são elementos celulares portadores dos genes (Lander e Weinberg, 2000).

Com a descoberta da estrutura do DNA por Watson e Crick (1953) e do código genético por Nirenberg e Matthaei (1961), descobertas subseqüentes permitiram o desenvolvimento de metodologias para descobrir a sequência de bases de uma determinada região do DNA (Sanger, 1975), a visualização de fragmentos específicos gerados por restrição enzimática (Southern, 1975) e, posteriormente, a amplificação de fragmentos específicos da molécula (Mullis e Faloona, 1987).

Os cientistas descobriram o DNA satélite em 1960, quando centrifugavam o DNA em um gradiente de densidade, verificando que ele apresentava-se em duas ou mais camadas: uma principal contendo os genes e bandas secundárias, que foram chamadas de bandas satélites. As bandas satélites mostraram-se como sendo constituídas de sequências de DNA repetidas e muito longas (Griffiths *et al.*, 2000).

A partir da década de 70, com a descoberta das enzimas de restrição na década anterior, surgiu o primeiro marcador molecular que possibilitou detectar diferenças entre indivíduos através de cortes no DNA estudado, o RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* (polimorfismo no tamanho de fragmentos de restrição). Com esta técnica, o DNA genômico de um indivíduo pode ser isolado e digerido com enzimas de restrição, os fragmentos obtidos são separados em um gel num processo denominado eletroforese, gerando fragmentos de tamanho e número variáveis que evidenciam o polimorfismo genético. Os fragmentos são transferidos para uma membrana de náilon ou nitrocelulose – técnica denominada *Southern blot*. A próxima etapa consiste na hibridização do DNA das amostras já imobilizado em membranas com uma sonda radioativa de DNA complementar ao fragmento de interesse. A última etapa é a autoradiografia, ou seja, exposição da membrana hibridizada com a sonda radioativa a um filme de Raios-X, revelando a presença de bandas, que são os marcadores RFLP (Helentjaris *et al.*, 1986).

Na década de 80, foi desenvolvido pelo pesquisador Kary Mullis uma tecnologia simples e eficiente que é a reação em cadeia da polimerase – PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Por meio deste processo é possível multiplicar *in vitro* e em escala exponencial cópias de um segmento específico de DNA, na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR se baseia na reassociação e extensão enzimática de um par de *primers* que delimitam a sequência de DNA de fita dupla, os *primers* são sintetizados artificialmente e são complementares às regiões que flanqueiam a região alvo. Cada ciclo de PCR envolve três etapas, desnaturação

através da elevação da temperatura para 92°C a 95°C, hibridização, em que a temperatura é rapidamente reduzida para 35°C a 60°C, e extensão que ocorre quando a temperatura é elevada para 72°C. Este ciclo é repetido por várias vezes e, ao final da reação, há uma grande quantidade de DNA de uma sequência específica de interesse. Os produtos da PCR podem ser visualizados num gel de agarose. Esta visualização é possível com auxílio do brometo de etídeo, que quando presente no gel se intercala entre as bases nitrogenadas do DNA e o torna visível com absorção de um comprimento de onda menor e emissão de um comprimento de onda maior de luz ultravioleta (Mullis & Falloona, 1987). A técnica de PCR promoveu também o surgimento de novos marcadores moleculares, como por exemplo, os marcadores RAPD, AFLP, RFLP e microssatélites.

Historicamente, os marcadores moleculares tiveram seu marco em meados da década de 60 com o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos. Até então, todos os estudos de genética se baseavam no controle por genes associados ou em caracteres morfológicos (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Em níveis populacionais, estudos baseados na eletroforese de aloenzimas têm provido inúmeras informações sobre a variabilidade genética dentro e entre populações. Entretanto, por razões concernentes à obtenção de baixos níveis de detecção de polimorfismo ou condições de estocagem, as aloenzimas nem sempre são consideradas apropriadas para tais estudos (Scribner *et al.*, 1994).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, foram estabelecidos métodos de detecção de polimorfismo em nível de DNA. Inicialmente, foram desenhados os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Grodzicker *et al.*, 1974) e mais recentemente técnicas baseadas na amplificação em cadeia utilizando uma DNA polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) (Mullis & Falloona, 1987). O surgimento da técnica de PCR, na década de 80, possibilitou a síntese enzimática de 15 milhões de cópias de determinados fragmentos de DNA. O desenvolvimento desta técnica viabilizou a concepção de diversos marcadores, como RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) (Williams *et al.*, 1990), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Vos *et al.*, 1995) e microssatélites (*Simple Sequence Repeats*) (Tautz, 1989). Desde então, os avanços no campo da biologia molecular vêm promovendo uma verdadeira revolução para estudos de variabilidade genética (Avise, 2004), cujos resultados contribuem expressivamente para o estabelecimento de estratégias de conservação de recursos genéticos e manejo de espécies (Soulé & Wilcox, 1980).

Os microssatélites envolvem o desenvolvimento de *primers* específicos, que é um processo elaborado e caro. Mas uma vez que estes estejam disponíveis, o custo da técnica assemelha-se ao de RAPD, com exceção de que os géis para resolver os fragmentos de DNA

devem ser de policrilamida e esses são de custo mais elevado. Uma das maiores vantagens dessa técnica é o polimorfismo revelado, o que a torna uma das melhores opções para uso na caracterização de cultivares, especialmente em germoplasma aparentado (Grise *et al.* 2006).

Segundo Matioli & Passos-Bueno (2001), a variabilidade genética é um instrumento de investigação muito importante para os pesquisadores em seus estudos quando desejam verificar afinidades e limites entre as espécies, detectar modos de reprodução e estrutura familiar, estimar níveis de migração e dispersão nas populações e até mesmo para ajudar na identificação de espécies ameaçadas de extinção. Os dados básicos para esses estudos, com a utilização de marcadores moleculares, são locos gênicos que apresentam alguma variabilidade.

Estudos de diversidade genética em populações naturais têm sido continuamente desenvolvidos na tentativa de se mensurar o nível de informações herdáveis em indivíduos, espécies e populações (Lowe *et al.*, 2004). Esses estudos comumente empregam informações provenientes de marcadores moleculares para estimar os níveis de diversidade e estrutura genética para um grande número de plantas e animais (Bachmann, 1993). Além disso, o uso de marcadores moleculares tem permitido o estudo da extensão e distribuição da variação genética entre espécies e de investigações taxonômicas e evolutivas (O'Hanlon *et al.*, 2000).

Os marcadores moleculares são um recurso muito útil em análises genéticas. Coelho (2000) ressalta a importância de se considerar o conteúdo informativo dos marcadores de natureza codominante (RFLPs e SSRs) em relação aos marcadores dominantes (RAPDs e AFLPs), além de aspectos como custo, tempo necessário para a realização das avaliações, e dificuldades práticas inerentes à execução de cada técnica.

4.6.1. Marcadores Microssatélites

Os genomas eucariotos são densamente povoados por sequências simples repetidas, as quais consistem de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em tandem e que estão espalhadas pelo genoma de um indivíduo. Tais repetições curtas em tandem (STR - *Short Tandem Repeat*) ou SSRP (*Simple Sequence Repeat Polymorphisms*) ou STMS (*Sequence Tagged Microsatellite Sites*) são também denominadas de microssatélites (Nybom *et al.*, 1992). São altamente polimórficos em plantas, animais e microorganismos. Em plantas seria mais fácil utilizar microssatélites GA (ou CT) e GT (ou CA). No entanto, os dinucleotídeos AT/TA são também instáveis em condições de PCR por formarem estrutura *hairpin*. Assim, cada região genômica que contenha um determinado número de repetições de uma destas sequências

constitui-se num loco genético, altamente variável entre indivíduos e multialélico, portanto, altamente informativo, figura 3 (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Comparativamente aos RFLPs, os microssatélites proporcionam 3 a 4 vezes mais polimorfismo ou informação. Entretanto, para o uso rotineiro dos microssatélites, há a necessidade de primeiro amplificar uma região, posteriormente sequenciá-la e em terceiro lugar, sintetizar os iniciadores específicos para cada loco. Uma vez feito isto, o loco marcador pode ser utilizado indefinidamente naquela espécie. Desta forma, existe um custo elevado e trabalhoso no início, mas o custo subsequente é baixo e a simplicidade a posteriori, é muito grande. O mapeamento genético e a caracterização varietal para fins de proteção de germoplasma e conservação de várias espécies estão sendo feitos com o uso dos marcadores microssatélites (Dantas e Nodari, 2006).

De acordo com Weber (1990), os microssatélites podem ser classificados em: i) Perfeitos: quando a sequência repetida não é interrompida por qualquer base que não pertença ao motivo, por exemplo: TATATATATATATATA; Imperfeitos: quando existe entre os motivos, pares de base que não correspondem ao mesmo, por exemplo: TATATATACATATA e iii) Compostos: quando a sequência possui duas sequências repetidas distintas e adjacentes, por exemplo: TATATATAGTGTGTGTGT.

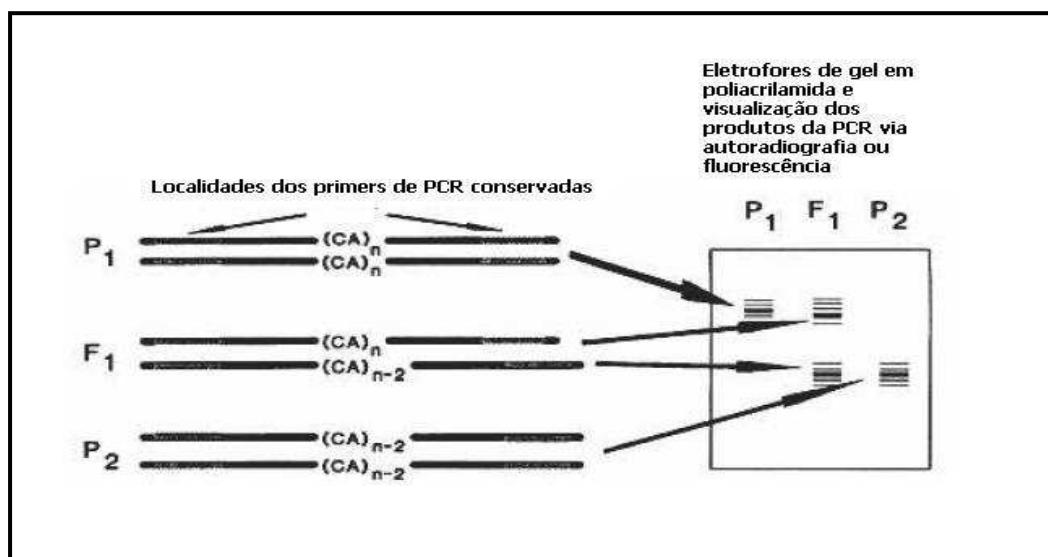


Figura 3 – Esquema de análise em gel de marcador microssatélite de três genótipos diplóides de plantas (P₁, P₂ e F₁). **Fonte:** Dantas e Nodari, 2006

Os marcadores microssatélites têm sido apontados como marcadores extremamente poderosos, sendo notoriamente aplicados em diversas áreas do conhecimento. Os microssatélites apresentam características altamente desejáveis (Suganuma & Ciampi, 2005), que são:

- são marcadores co-dominantes, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto podem ser visualizados no gel;
- estão amplamente e uniformemente distribuídos pelo genoma dos eucariotos;
- são altamente multialélicos;
- são amplificados via PCR, o que facilita sua obtenção mesmo com poucas quantidades de DNA;
- uma vez desenvolvidos os *primers* que amplificam tais regiões do genoma, estes podem ser facilmente compartilhados entre laboratórios;
- *primers* marcados com fluorescência apresentam a vantagem de possibilitarem sistema multiplex, o que permite avaliar rapidamente um grande número de indivíduos para um grande número de locos em pouco tempo.

O uso de marcadores co-dominantes possibilita a obtenção de informações que fornecem subsídios para entender a dinâmica evolutiva das espécies auxiliando na adoção de estratégias de conservação e melhoramento genético, manejo de populações naturais, podendo determinar o impacto da influência antrópica na variabilidade das espécies (Hamrick, 1989; Seoane *et al.*, 2001).

Além disso, os microssatélites são considerados bastante robustos por não apresentarem, em geral, influências ambientais, sendo qualificados como marcadores neutros (Morgante & Olivieri, 1993; Goldstein & Schlötterer, 1999; Avise, 2004).

Os marcadores microssatélites foram descritos em plantas pela primeira vez por Condit & Hubbell (1991), que detectaram a presença das repetições (AC)_n e (AG)_n. No genoma de plantas superiores a repetição (AC)_n é geralmente menos frequente do que em mamíferos, sendo o motivo (AT)_n o mais encontrado, seguido por (A)_n e (AG)_n. Repetições de trinucleotídeos e tetranucleotídeos também foram encontrados no genoma de plantas, sendo os motivos mais frequentes (AAT)_n, (AAC)_n, (AGC)_n, (AAG)_n, (AATT)_n e (AAAT)_n (Wang *et al.*, 1994). Morgante & Olivieri (1993) constataram em 34 espécies vegetais a presença de microssatélites, sendo o dinucleotídeo AT o elemento repetido mais comum. Também constataram que estes marcadores estão em menor frequência que nos vertebrados, mas em maior frequência que nos invertebrados e fungos.

Enquanto o número de repetições de um microssatélite geralmente varia, a sequencia de bases adjacentes ao microssatélite pode ser única no genoma e conservada (no mesmo loco) entre diferentes indivíduos da mesma espécie. Assim, pode-se desenhar um oligonucleotídeo específico para as sequências adjacentes a um dado microssatélite, de forma que, através de uma reação de PCR será possível amplificar este loco em diferentes genótipos. Como o número de unidades repetidas em tandem em um microssatélite pode ser variável em diferentes genótipos, os produtos de amplificação dos diferentes indivíduos mostrarão um polimorfismo no tamanho do fragmento amplificado (Souza, 2001).

Segundo Slatkin (1995) os microssatélites são marcadores ideais para estudos de genética e evolução de populações naturais devido ao alto poder discriminatório, à robustez, confiabilidade, praticidade operacional e por serem marcadores altamente informativos geneticamente.

Vários trabalhos utilizando SSR foram desenvolvidos com sucesso para avaliar a diversidade genética entre genótipos, como o desenvolvido por Akkaya *et al.* (1992) que demonstraram que SSRs estavam presentes em genótipos de soja e altos níveis de polimorfismo foram detectados entre os grupos. Foi observada uma média de 7 alelos em cada 3 locos SSRs, permitindo assim a identificação de 43 genótipos de soja.

Outro trabalho que demonstrou a capacidade dos marcadores SSRs foi desenvolvido por Kijas *et al.* (1995), mostrando que há grande variação de tamanho nos locos SSRs em espécies de citros. Neste trabalho foram avaliados acessos provenientes de um cruzamento intergenérico entre limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck) e *Poncirus trifoliata*. Foram analisados dois locos SSRs quanto à variação e herança alélica, a partir da amplificação e hibridização com a sonda TAA. Demonstrou-se com este estudo que todas as plantas da progénie avaliada apresentaram o SSR (TAA) indicando assim que a região flanqueadora é conservada nos diferentes genomas testados.

Em trabalho semelhante, Saha *et al.* (2003) avaliaram a presença de SSR em cDNA de 11 acessos de algodão e 4 gêneros próximos. Trinta e um pares de oligos SSR, dos 120 testados, amplificaram fragmentos de cDNA. A análise das sequências mostrou que 25% dos 24 clones de cDNA selecionados aleatoriamente amplificaram regiões contendo repetições e mostraram que os SSR contendo cDNA foram conservados em duas diferentes espécies de algodão (*Gossypium barbadense* e *G. hirsutum*). Este estudo revelou a importância dos marcadores SSR para o mapeamento comparativo de genes transcritos.

O emprego da tecnologia dos microssatélites envolve algumas limitações, como a grande quantidade de trabalho necessário para o desenvolvimento de *primers* específicos para os locos de microssatélites de cada espécie. Entretanto, ocorre conservação de sítios

microssatélites entre espécies relacionadas, possibilitando aproveitar *primers*, denominados heterólogos, que foram desenvolvidos para uma espécie e empregá-los nas demais espécies do gênero (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A principal limitação refere-se ao custo e ao esforço inicial requerido para a clonagem e sequenciamento das regiões que flanqueiam a região microssatélite, para a obtenção de *primers*. Os métodos atuais para descobrimento de marcadores baseados em SSR tipicamente requerem a construção de uma biblioteca genômica, triagem de uma biblioteca para elementos repetitivos, sequenciamento do DNA de clones positivos, desenho dos *primers*, seleção dos locos informativos e caracterização da variação alélica (Zane *et al.* 2002, Souza, 2001 e Grattapaglia, 2001). Porém, este custo é amplamente compensado pela ampla gama de potencialidades de pesquisa e desenvolvimento que se abrem ao se possuir tal tecnologia para uma determinada espécie (Grattapaglia, 2001). Além disso, uma vez desenvolvidos, o seu custo de utilização equivale ao de outros marcadores baseados em DNA.

Devido ao alto grau de polimorfismo, os microssatélites têm sido empregados em diferentes situações na área vegetal. Tais marcadores foram empregados com sucesso na discriminação entre acessos e cultivares de bancos de germoplasma, detectando duplicações, mistura de sementes, deriva e cruzamentos não controlados (Melo, 2000; Souza, 2002). Também foram empregados na determinação do grau de parentesco de indivíduos (Yang *et al.* 1993 e Melo, 2000), na determinação de origem parental por teste de paternidade (Gaiotto *et al.*, 2003) e na construção de mapas genéticos de ligação (Wu & Tanksley, 1993, Brondani *et al.*, 1998). Em espécies arbóreas tropicais, os microssatélites foram descritos e empregados com sucesso em estudos de sistema reprodutivo, fluxo gênico e estrutura genética de populações, tais como: *Pithecellobium elegans* (Chase *et al.*, 1996), *Carapa guianensis* (Dayanandan *et al.*, 1999), *Caryocar brasiliense* (Collevatti, 2001), *Euterpe edulis* (Gaiotto, *et al.*, 2003).

Em genética de populações de plantas, o emprego de microssatélites teve uma grande contribuição na melhoria das estimativas de parâmetros genéticos, especialmente em populações com diversidade baixa ou não detectada por outros marcadores. Em estudos de conservação ambiental, esses marcadores têm uma importância muito grande pela alta eficiência apresentada (Paetkau, 1995).

4.6.2. Aplicações de Marcadores na Conservação Ambiental

Os estudos voltados para conservação de populações ou espécies de importância econômica ou em risco de extinção fornecem dados que constituem uma base essencial na

tomada de medidas de manejo de populações selvagens ou cultivadas. A concatenação das diversas áreas de estudos populacionais, tais como biologia, ecologia e genética é uma tendência atual, sendo que, nesta última, o desenvolvimento de técnicas que possibilitam a detecção da evolução de diferentes genótipos enriqueceu a gama de ferramentas utilizáveis no suprimento de necessidades. Dentre estas necessidades estão a identificação de indivíduos e estimativa do grau de parentesco entre eles, a delimitação de populações de interesse, estimativa do grau de variabilidade das mesmas, bem como de sua história recente, e estimativa do grau de similaridade entre populações e espécies, com a construção de árvores filogenéticas (Marques, 2002).

A biologia molecular tem sido a ferramenta escolhida para os estudos de genética de populações e que tem acumulado avanços importantes, gerando técnicas cada vez mais precisas para o exame de segmentos de DNA. Ela tem contribuído também para a descoberta de variados marcadores moleculares aplicáveis aos mais diversos problemas encontrados no estudo de populações e às análises estatísticas que permitem desde a estimativa do grau de variabilidade genética de uma dada população à construção de árvores filogenéticas, relacionando espécies próximas e elucidando questões de parentesco (Marques, 2002).

Portanto, o sucesso de qualquer programa de conservação é dependente do conhecimento da quantidade de variação presente na espécie de interesse. Caracteres morfológicos e agronômicos, usados para a medição da diversidade genética em determinadas populações de indivíduos possuem uma grande dificuldade na identificação de grupos taxonômicos discretos. Esta dificuldade deve-se ao fato de que a grande maioria dos caracteres vegetais é influenciada por fatores ambientais, exibindo variação contínua e um alto grau de plasticidade fenotípica. Para tentar solucionar estes problemas, técnicas moleculares têm sido utilizadas para monitorar a variabilidade genética (Parker *et al.*, 1998).

Os recentes avanços na biologia molecular abriram novas perspectivas para a pesquisa em conservação de espécies e para os estudos de biologia populacional como um todo. Pela primeira vez a variação encontrada em plantas e animais pode ser analisada no DNA. Diferenças na sequência genética podem ser diretamente observadas e descritas com um grau de precisão impraticável há pouco tempo atrás. Os marcadores moleculares são uma destas técnicas (Marques, 2002).

Os marcadores moleculares estão facilitando a realização de estudos de genética, taxonomia e evolução de plantas proporcionando um substancial avanço no conhecimento científico. As principais implicações deste avanço no conhecimento se refletem no poder, precisão e rapidez na manipulação da variabilidade genética. Assim a conservação de plantas pode se beneficiar de várias maneiras através dos marcadores moleculares, como na

construção de mapas genéticos (Ganal *et al.*, 1991), caracterização da variabilidade genética (Goldstein & Schlotterer 2001), monitoramento (Sonstebø; Borgstrom; Heun, 2007), "fingerprinting" (Weising *et al.*, 2005) seleção assistida por marcadores (Lande e Thompson, 1990), clonagem de genes (Chaves, 2002), estudos de crescimento e desenvolvimento das plantas (Nodari *et al.*, 1992).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Áreas de estudo

A área escolhida para coleta está localizada na Área de Proteção Ambiental de Pandeiros (APA-Pandeiros), sob monitoramento do Instituto Estadual de Florestas – IEF/MG, situada na região Norte do Estado de Minas Gerais, no município de Januária ($15^{\circ} 29' 7''$ Latitude Sul e $46^{\circ} 21' 32''$ Longitude Oeste), região de abrangência da Bacia do Rio São Francisco (Figura 4). Nesta área foram escolhidas duas populações para este estudo: a) população 1, presente na comunidade sede do IEF (Vila) e caracterizada como população explorada pela comunidade e b) população 2, presente na localidade denominada Pindaibal (população não explorada).

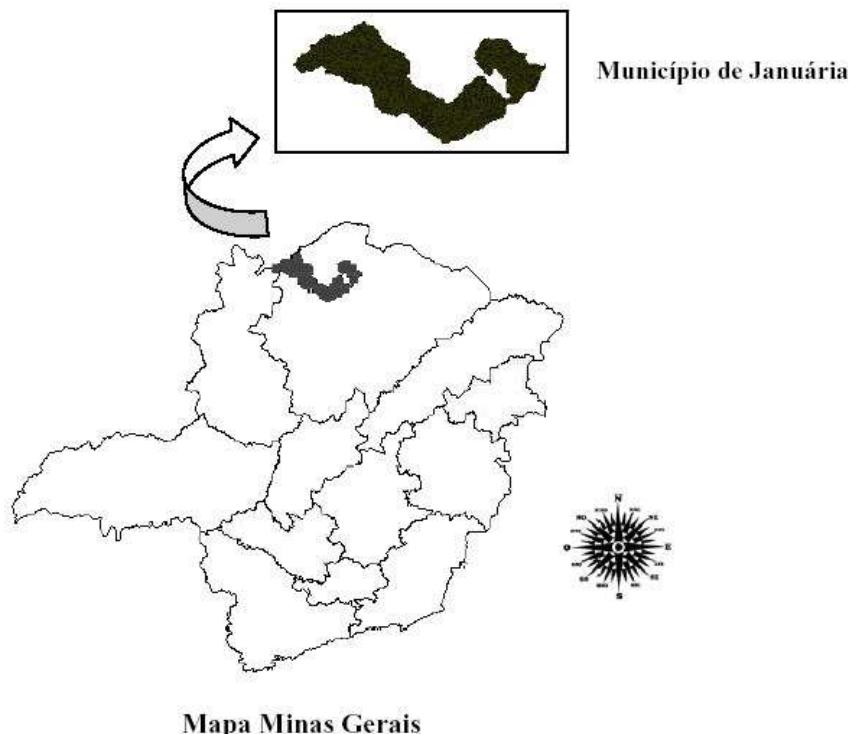


Figura 4 - Localização do município de Januária. **Fonte:** Galizoni (2005).

5.2. Material biológico para estudos genéticos

Para a construção da biblioteca genômica e desenvolvimento dos marcadores moleculares SSR, o material genético (DNA total) foi obtido a partir de folhas jovens coletadas de 1 indivíduo adulto (reprodutivo) presente em uma população natural de *M. flexuosa* que foram enviadas ao Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Brasília, DF.

5.3. Extração e amplificação do DNA

O DNA foi extraído a partir de 500 mg de tecido vegetal macerado utilizando o protocolo CTAB 2% descrito por Doyle & Doyle (1990) com as modificações a seguir: (1) Em eppendorffs de 2 mL identificados para cada amostra foram adicionados 150 mg do tecido macerado pelo triturador mini beadbeater; (2) foram adicionados 800 μ L de tampão de extração (pré-aquecido a 65°C), os tubos foram fechados e agitados para ressuspender o tecido no tampão; (3) foram levados ao banho-maria (65 °C) por 60 minutos, agitando-os manualmente a cada 10 minutos; (5) após serem retirados do banho-maria e com a mistura em temperatura ambiente foram adicionados 600 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e os tubos foram agitados por 5 minutos invertendo-os no mínimo 20 vezes até fazer uma emulsão homogênea; (6) os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 12.000 rpm; (7) o sobrenadante foi transferido para novos tubos também marcados; (8) foram adicionados 70% (v/v) do volume (\approx 400 μ l) de isopropanol gelado, misturado suavemente até formar um precipitado; (9) os tubos foram centrifugados durante 15 minutos a 12.000 rpm; (10) suavemente foi descartado o máximo de sobrenadante invertendo os tubos sem perder o pellet; (11) foi adicionado 1 mL de etanol 70% (v/v) para lavar o precipitado, deixando-o imerso por 5 a 10 minutos, invertendo-o suavemente; (12) os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 12.000 rpm; (13) foi retirado o máximo do etanol sem perder o pellet; (14) foi adicionado 1 mL de etanol 100% (v/v) para lavar o precipitado, invertendo-o suavemente; (15) os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 12.000 rpm; (16) foi retirado o máximo do etanol e o pellet secou em temperatura ambiente; (17) cada precipitado foi dissolvido em 100 μ L de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0) acrescido de 1 μ L RNase (10mg/mL) e deixado em *overnight*. As amostras foram então armazenadas a -20°C (Figura 5).

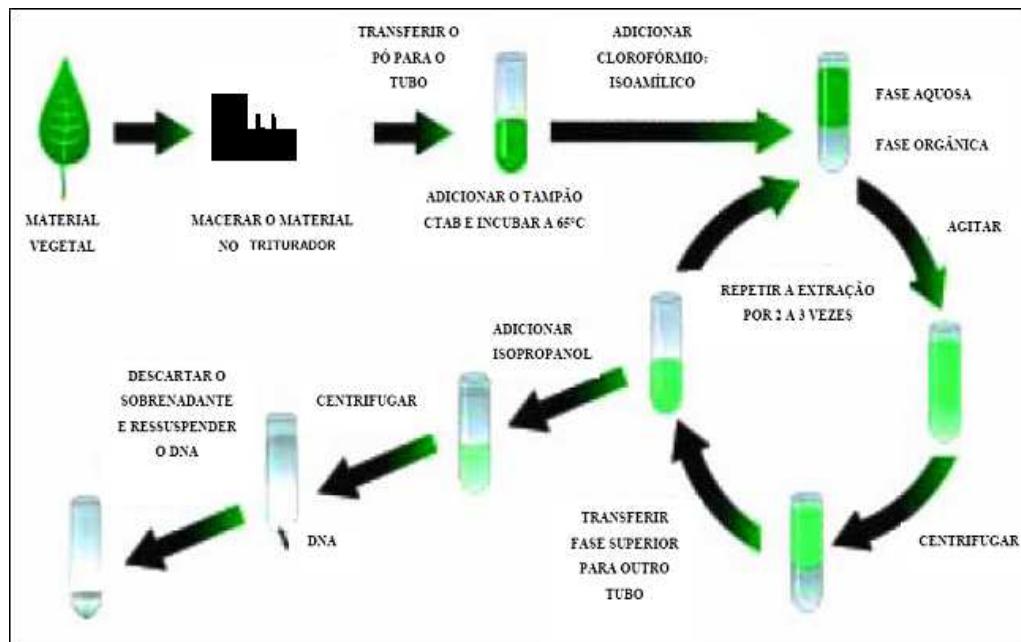


Figura 5 – Esquema representativo adaptado das etapas de extração de DNA pelo método CTAB 2%. **Fonte:** Romano & Brasileiro, 2005.

5.4. Construção de biblioteca genômica enriquecida

As estratégias clássicas de isolamento de microssatélites envolvem a construção de bibliotecas genômicas selecionadas para certo tamanho de inserto, e o *screening* de milhares de clones com sondas apropriadas (Rassman, Schlötterer e Tautz, 1991).

A construção da biblioteca genômica enriquecida com locos microssatélites foi feita utilizando o protocolo descrito por Rafalski *et al.* (1996) com modificações de Buso *et al.*, 2003, conforme a Figura 6.

A metodologia utilizada neste trabalho foi a da construção de biblioteca genômica enriquecida para poli AG/TC. Este protocolo envolveu uma série de etapas, e o uso de controles, principalmente nas etapas de: i) digestão do DNA; ii) seleção dos fragmentos enriquecidos; iii) amplificação por PCR dos fragmentos enriquecidos; iv) seleção de clones positivos; v) PCR dos insertos com poli AG/TC e purificação do DNA para o sequenciamento. Sabe-se que não existem iniciadores específicos para o buriti e testes com *primers* entre espécies relacionadas ainda não foram feitos e publicados.

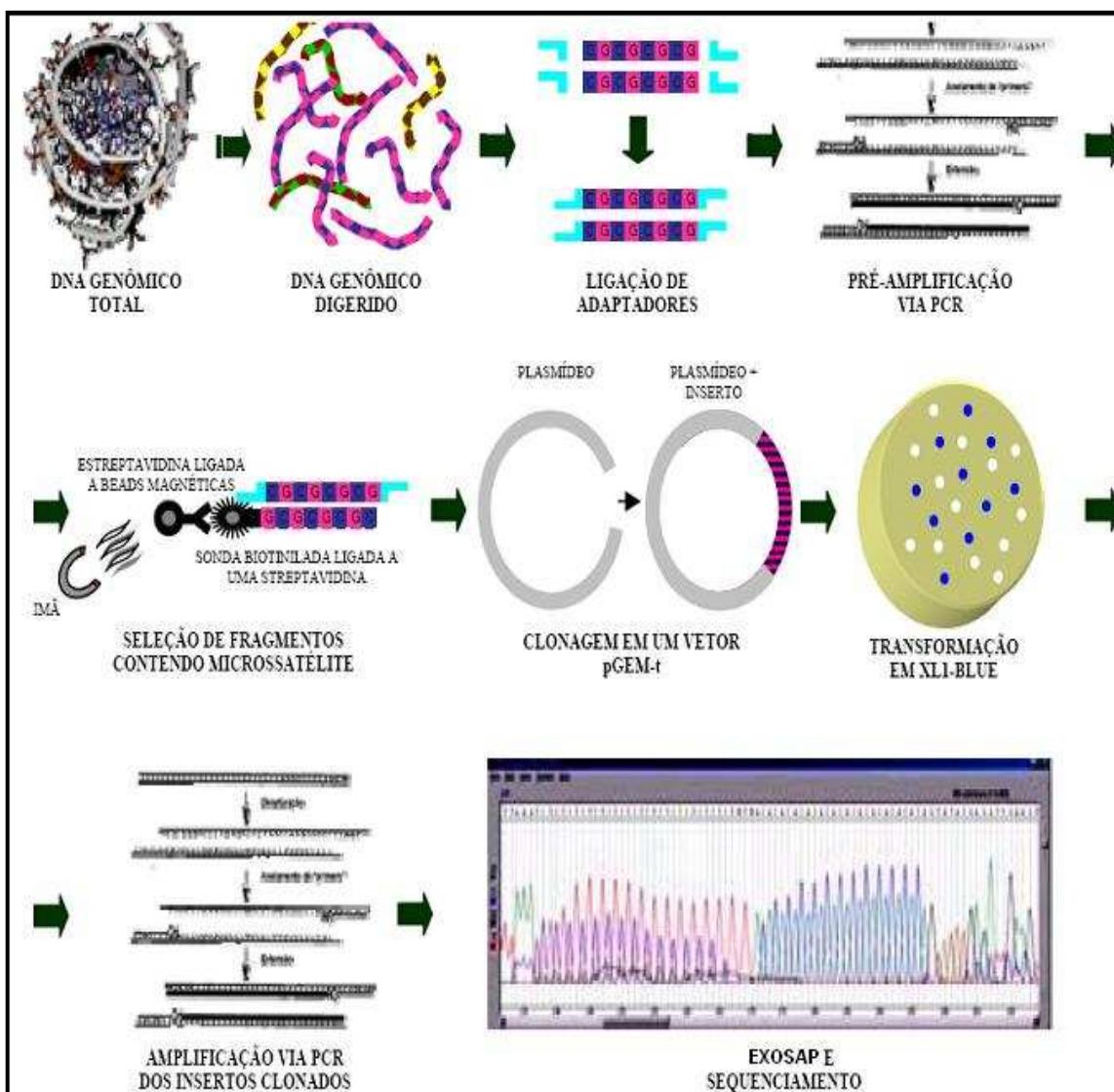


Figura 6 – Esquema representativo das etapas da construção da biblioteca enriquecida com microssatélites. **Fonte:** Nucci, 2007.

5.4.1. Seleção da enzima para digestão do DNA

Após a extração do DNA total, foi feita uma avaliação da digestão com três diferentes enzimas de restrição, *Mse*I (\downarrow TAA), *Sau*3A (\downarrow GATC), e *Tsp*509 (\downarrow AATT) para verificar a eficiência da ação enzimática na segmentação do DNA e a que obtivesse maior quantidade de fragmentos na proporção de 200 a 800 pb. A Tabela 2 mostra os reagentes utilizados no processo de seleção da enzima.

Tabela 2 – Reagentes utilizados no teste da digestão enzimática após a extração do DNA.

	MseI	Sau3A	Tsp509
Água miliQ (μL)	5,5 μL	6,5 μL	6,5 μL
Tampão 10x	1 μL NEB 2	1 μL React 4	1 μL NEB 1
BSA (10ng/mL)	1 μL		
Enzima (10u/μL)	0,5 μL	0,5 μL	0,5 μL
DNA (300 μg/μL)	2 μL	2 μL	2 μL
Total	10 μL	10 μL	10 μL

Após o preparo da reação de digestão, as amostras foram centrifugadas rapidamente (spin), sendo que, o tubo 1 continha a MseI e o tubo 2 a Sau3A, ficando ambos os tubos em estufa a 37 °C em *overnight*. O tubo 3 que continha a Tsp509 ficou no banho-maria a 65°C também em *overnight*. Em seguida o material foi submetido ao processo de eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v), Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X e 4,5 μL de brometo de etídeo para migração das reações de digestão e quantificação do DNA. Foram utilizados três pesos moleculares para avaliar o tamanho dos fragmentos que são: 1Kb, Ø174 e Kb Plus. O DNA foi visualizado com trans-iluminador com luz ultravioleta/366 nm. (Figura 7).

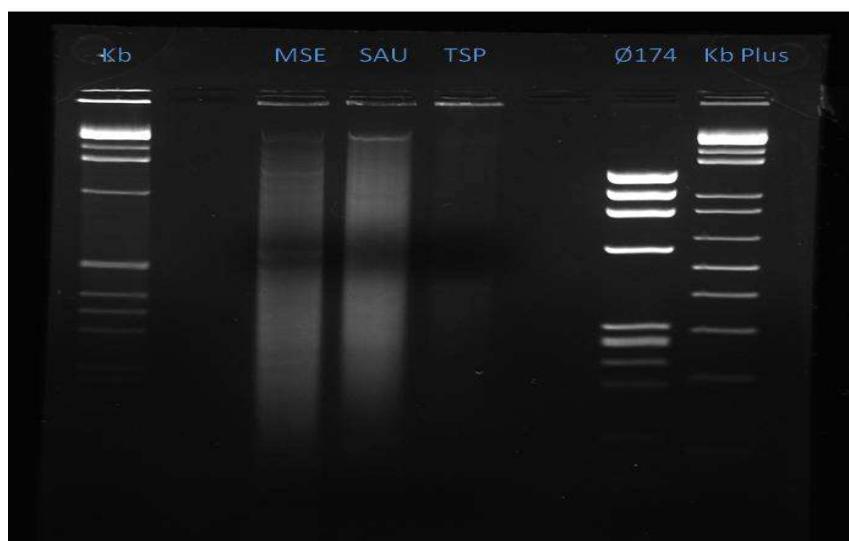


Figura 7 - Gel de eletroforese do ensaio de digestão enzimática com as enzimas MseI, Sau3A e Tsp509.

Após eletroforese a quantificação das amostras foi estimada pela intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídeo sob UV (ultravioleta) em gel de agarose a 1% (p/v), TBE 1X e 4,5 μL de brometo de etídeo. Essa intensidade foi comparada à de padrões com pesos moleculares e concentrações específicas e conhecidos de DNA do fago λ (Gibco).

Foram utilizadas 10 amostras de DNA de buriti em diferentes diluições e 4 pesos moleculares DNA λ (invrtogem) em diferentes concentrações conforme mostra a tabela 3.

Tabela 3 – Amostras utilizadas na quantificação do DNA de buriti.

Tubos	Amostras	Concentrações
1	DNA λ 2 μ L	10 ng/ μ L
2	DNA λ 5 μ L	10 ng/ μ L
3	DNA λ 2 μ L	50 ng/ μ L
4	DNA λ 2 μ L	100 ng/ μ L
5	2 μ L DNA buriti (amostra 01)	250 ng/ μ L
6	2 μ L DNA buriti (amostra 01)	Diluído 25:1
7	4 μ L DNA buriti (amostra 01)	Diluído 25:1
8	2 μ L DNA buriti (amostra 03)	250 ng/ μ L
9	2 μ L DNA buriti (amostra 03)	Diluído 25:1
10	4 μ L DNA buriti (amostra 03)	Diluído 25:1
11	2 μ L DNA buriti (amostra 06)	250 ng/ μ L
12	2 μ L DNA buriti (amostra 06)	Diluído 25:1
13	4 μ L DNA buriti (amostra 06)	Diluído 25:1
14	2 μ L DNA buriti (amostra 06)	Diluído 25:1

As amostras foram aplicadas em gel de agarose a 2%, aplicando-se 2 μ L de Ficol 15%. Nas colunas 1, 2, 3 e 4 foi aplicado o peso molecular λ e 10 μ L de tampão de carreamento (TC). O gel correu a 75 volts durante 1 hora (Figura 8).

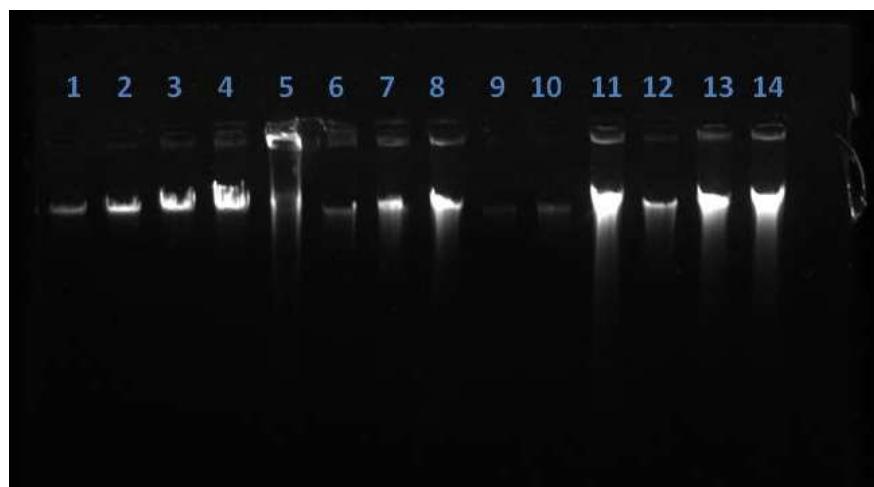


Figura 8 – Primeira quantificação das amostras de DNA do buriti.

5.4.2. Eluição dos fragmentos de DNA em gel de agarose

Após a primeira quantificação foi realizada uma nova quantificação com um pente preparado com 4 poços unidos, no qual foi feita a digestão do DNA para o desenvolvimento da biblioteca usando a enzima Sau3A (Gibco) na concentração de 10U/ μ L, a qual se mostrou

mais eficiente no teste de digestão enzimática. Nesta reação foram utilizados 55 μ L de água miliQ, 20 μ L tampão 10X react 4, 130 μ L de DNA (600 ng/ μ L) e 25 μ L da enzima (10U/ μ L), totalizando 200 μ L, e incubado a 37°C em *overnight* (Figura 9A). Após foi feito a quantificação da eluição dos fragmentos de 200 a 800 pb que foram recuperados do gel por meio de purificação através do kit *Qiaquick Gel Extraction* (Qiagen) no qual foram utilizados os marcadores de peso molecular conhecidos. O procedimento de recuperação do DNA segue os seguintes passos: 1^a etapa o gel a 2% (p/v) da segunda quantificação foi cortado com uma massa variando em torno de 400 a 430 mg e inseridos em eppendorfs de 2 mL, num total de 6 tubos, os quais foram adicionados 1260 μ L da solução QG, em cada tubo. Na 2^a etapa os tubos foram deixados em banho-maria por 10 minutos a 50 °C, sendo agitados de 2 em 2 minutos. Na 3^a etapa foram adicionados 400 μ L de isopropanol, invertendo e agitando, após, foi montando em uma coluna e centrifugado a 1 minuto. Na 4^a etapa foram adicionados 500 μ L de QG e centrifugado por 1 minuto. Na 5^a etapa foram adicionados 750 μ L de PE, deixado reagir por 5 minutos e em seguida centrifugado por 1 minuto. Na 6^a etapa a coluna foi colocada em tubos de 1,5 mL e o DNA recuperado em 20 μ L de água miliQ. A 7^a etapa e final, 2 μ L de DNA digerido (fragmentos de 200 a 800 pb), foi quantificado em gel de agarose a 2% (Figura 9B).

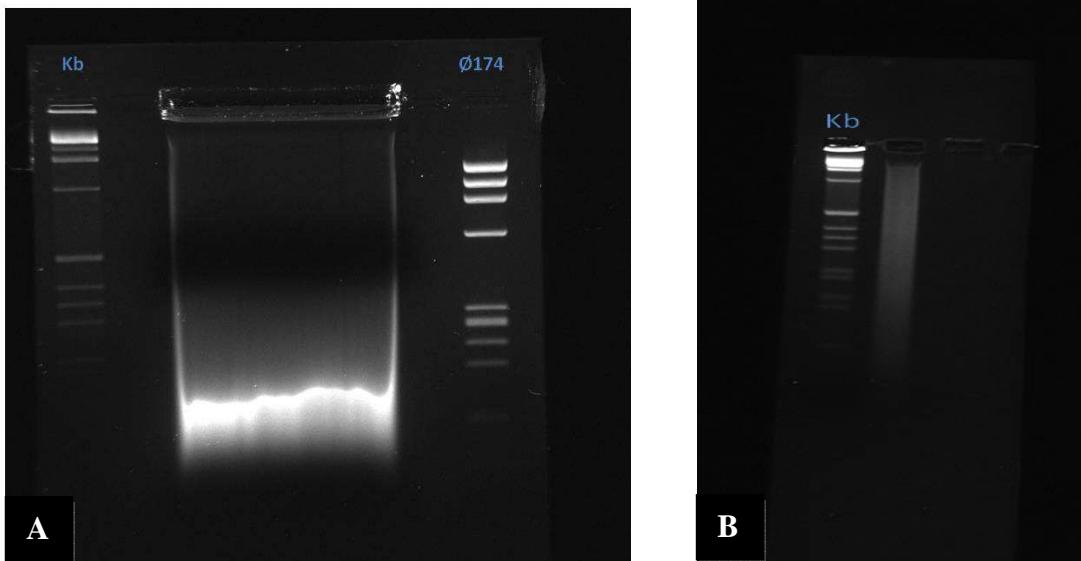


Figura 9 – (A) Segunda quantificação feita com o pente de 4 poços unidos, utilizando os marcadores Kb e ϕ X174 (B) Quantificação da eluição dos fragmentos de 200 a 800 pb utilizando o marcador Kb.

5.4.3. Ligação do DNA aos adaptadores e ligação de biotina aos oligonucleotídeos

Nesta parte do desenvolvimento dos microssatélites, a primeira etapa foi a preparação da biotina para ligação ao Oligo (TC)₁₄. A Tabela a seguir mostra os reagentes utilizados neste preparo.

Tabela 4 - Reagentes utilizados no preparo da biotina.

Reagentes	Volume (μL)
Água MiliQ	24
Tampão 10x (NeBuffer 4)	4
CoCl ₂ (0,25 mM 10x)	4
Oligo (TC) ₁₄ (100 μM)	2
Biotina 16 ddUP (25 nmol)	2
Terminal Transferase (20 U/μL)	4
Total (μL)	40

Após a mistura, a reação foi incubada a 37°C por 30 minutos, logo em seguida foram aplicados 4 μL de EDTA (0,5 M) para inativação enzimática, a solução foi precipitada com 2,5 volumes com etanol absoluto a -20°C e deixado em *overnight*.

Na segunda etapa, foi feita a ligação dos adaptadores ao DNA digerido. Os adaptadores *Long SAU* (5' - GAT CGG TGA ATT CGG CTC TAG GTC G - 3') e *Short SAU* (5' - CAG CTT AGA GCC GAA TTC ACC- 3') foram ligados aos fragmentos digeridos de extremidade abrupta com a enzima T4 DNA ligase (Introgen). Foram utilizados 3 μL do adaptador *Long SAU* (200 μM) e 3 μL do adaptador *Short SAU* (200 μM), 20 μL do DNA genômico digerido no passo anterior, 12 μL do tampão 10X (50 mM Tris-HCl, pH 7,8; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 25 μg/ml BSA), 6 μL de T4 DNA ligase (400 U/μL) e 76 μL de água milliQ autoclavada para completar 120 μL, o volume total desta solução. Esta reação foi incubada a 20°C por *overnight*.

Em seguida a biotina deixada *overnight* foi centrifugada por 15 minutos a 13.000 rpm, lavada 2x com etanol 70% (500 μL). O etanol foi retirado e o material deixado para secar. Logo após, foi ressuspendido em 30 μL de água miliQ.

5.4.4. Enriquecimento da biblioteca - preparo das contas magnéticas para hibridização

No enriquecimento da biblioteca, foram preparadas as contas magnéticas adicionando 1 mg de beads (*Dynabeads – Streptavidin Boehringer Mannheim*) a 10 mg/mL em um tubo de 2 mL, lavados 2x com 900 μL PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) pH 7,0 + 100 μL de BSA a 10 mg/mL injetando 400 μL de cada vez, logo após foi usado um imã para separar as beads da solução aquosa (Figura 10), depois da separação magnética o sobrenadante foi descartado e as beads lavadas uma vez com 400 μL de tampão 1X BEW após uma nova separação magnética o material foi ressuspendedido em 200 μL do estoque de 2X BEW e acrescentado 170 μL de

água, deixando as beads mais alcalinas para a ligação com a biotina. Finalizado o processo foi adicionado 30 μ L da solução preparada de Bio-Oligo (biotina mais oligo) e agitado a temperatura ambiente por 60 minutos no vórtex mixer. Novamente após a agitação a solução foi lavada uma vez com 400 μ L de 1X BEW, depois uma vez com 400 μ L de 5X SSPE com 0,1% SDS ressuspensionado em 150 μ L de 10X SSPE com 0,2% de SDS (pré-aquecido a 65°C) e deixado a 65°C por 15 minutos e armazenado a 4°C.



Figura 10 – Na seta azul o imã utilizado para separar as contas magnéticas (beads) das soluções aquosas. Na seta verde o eppendorf com a solução.

5.4.5. Hibridização do DNA+adaptador ao complexo Bio-oligos-conta e PCR para controle do enriquecimento da biblioteca

Terminado o processo de preparação do complexo bio-oligo-conta foi realizada a hibridização com o DNA ligado ao adaptador, assim foram transferidos 120 μ L de DNA+adaptador para um tubo de 1,5 mL e adicionado 30 μ L de água deixando um volume final de 150 μ L. Foi feita uma diluição 1:1000 (1 μ L de DNA+adaptador em 999 μ L de água) colocando em um tubo enumerado (**tubo 1**) servindo de controle e desnaturado a 95°C durante 10 minutos no bloco térmico (Marca *Fisher Scientific*). Utilizando o *kit Hybridization Solution* a solução foi recuperada e colocada em um novo tubo (**tubo 2**), lavada 2 vezes com 400 μ L 2X SSPE + 0,1% SDS por 5 minutos cada e recuperada a solução - 1^a lavagem (**tubo 3**) o sobrenadante foi posto em outro tubo - 2^a lavagem (**tubo 4**), após a solução foi lavada uma vez com 400 μ L 2X SSPE + 0,1% de SDS por 15 minutos a 65 °C. A solução foi recuperada - 3^a lavagem (**tubo 5**) e ressuspensionada uma vez com 400 μ L 2X SSPE (**tubo 6**). As

beads foram ressuspensas em 200 μ L de água (**tubo 7**). Assim, o controle de enriquecimento da sonda (AG)₁₄ via PCR com o objetivo de avaliar se houve perda de DNA nas lavagens foi feito com 7 alíquotas diferentes: **1**-DNA controle (1:1000); **2**-Solução de hibridização; **3**-Solução da 1^a lavagem; **4**-Solução de 2^a lavagem; **5**-Solução da 3^a lavagem; **6**-Solução de enxague e **7**-Solução com DNA ligado as contas magnéticas. Os reagentes utilizados na PCR estão descritos na tabela 5. A amplificação dos fragmentos por PCR foi realizada utilizando o seguinte programa: 94°C por 3 minutos ou 94°C por 2 minutos, 25 ciclos com etapas de desnaturação (45 segundos a 94°C), ligação (45 segundos a 56°C) e extensão (2 minutos a 72°C); e uma etapa final de extensão de 7 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio (Figura 11).

Tabela 5 – Reagentes utilizados na reação de amplificação das sete soluções na hibridização.

Reagentes	Volume (μ L)	Mix de 8 Reações (μ L)
DNA	2	
Tampão 10x Buffer + MgCl₂	2,5	20
10 μM de Primer SAU	2,5	20
2,5 mM de dNTP	2,5	20
Taq 5U	2	16
Água	4	122,4
Total	25	184



Figura 11 – Resultado da PCR para controle do enriquecimento da biblioteca (sete soluções mais o peso molecular distribuído em oito poços). **1º poço** (Marcador Ladder Kb), **2º poço** (Tubo 1 - diluição 1:1000), **3º poço** (Tubo 2 - solução de hibridização), **4º poço** (Tubo 3 - 1^a lavagem), **5º poço** (Tubo 4 - 2^a lavagem), **6º poço** (Tubo 5 - 3^a lavagem), **7º poço** (Tubo 6 - solução de enxague e no **8º poço** (Tubo 7 - DNA ligado às beads).

5.4.6 – Purificação das reações de PCR após a hibridização

Foram realizadas 36 reações de PCR das beads hibridizadas ao DNA ligado ao adaptador (Figura 12A) e logo após uma purificação destas PCRs utilizando o kit de purificação QIAquick PCR Purification (Qiagen®) dividindo o volume em dois eppendorfs de 2 mL com 400 μ L cada um. As beads foram retiradas por separação magnética, o volume distribuído em três tubos em cinco volumes de PB (2000 μ L) inseridos em cada tubo. Em um tubo de coleta com coluna *QIAquick spin* foram passados 700 μ L por 60 segundos. Depois foi deixado por 1 minuto na centrífuga para homogeneizar. Após, foi lavado utilizando 750 μ L de tampão PE e centrifugado por 1 minuto, descartado o líquido do fundo, retornado o tubo a coluna e centrifugado mais uma vez. No final, foram acrescentados 20 μ L de água MiliQ no centro para recuperar o DNA, deixado por 1 minuto e centrifugado por 1 minuto a 12.000 rpm. A quantificação do DNA purificado foi feita em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, com 2 μ L do marcador molecular Ladder, 2 μ L da amostra de DNA purificado e 2 μ L de tampão (Figura 12B).

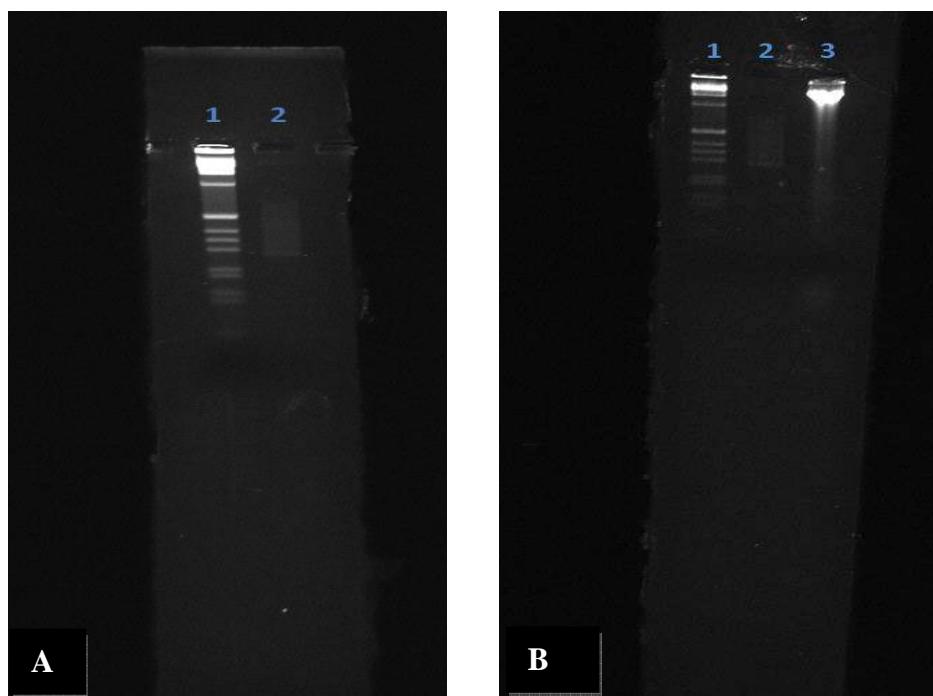


Figura 12 – (A) Quantificação da PCR das beads. **(B)** Quantificação do DNA após purificação. No poço enumerado 1 está o peso molecular ladder, no poço 2 a amostra aplicada não purificada e no poço 3 a amostra purificada.

5.4.7. Ligação do DNA ao plasmídeo pGEM-T, transformação e repicagem de colônias

Após a hibridização e purificação, 3 μ L dos produtos da PCR (DNA purificado) foram ligados a 1 μ L do vetor pGEM-T Easy Vector (kit Promega) de concentração a 50 ng/ μ L (Figura 13), segundo o protocolo fornecido com o vetor plasmidial, utilizando 1 μ L de T₄ Ligase (3U/ μ L) e 5 μ L de tampão T₄ ligase 2X, totalizando 10 μ L de volume para esta reação que foi incubada em geladeira (4°C) *overnight*. Foram preparadas várias placas com meio NZY Agar (Botton-agar).

Para crescimento das bactérias foram adicionados 50 μ L de bactérias competentes *Escherichia coli* cepa XL1-Blue armazenadas a -80°C, 1 μ L de água e 3 μ L de ligação. A transformação foi realizada pelo procedimento de eletroporação (Chassy *et al.* 1988; Dower *et al.*, 1988) montado em uma cuba Gene Pulser® (Biorad) (Figura 14). Em 1 pulso de 1.8 volts no tempo de 4 a 6 segundos, onde os 50 μ L das bactérias mais ligação foram eletroporados e imediatamente após acrescido 1 mL de meio. Em seguida foi deixado no shaker agitando a 37°C por uma hora. Acrescentou-se às placas de petri 200 μ L de meio NZY Agar (caseína hidrolizada 10g, extrato de levedura 5g, NaCl 5g, MgSO₄.7H₂O, pH 7,5) contendo 0,013 g de ampicilina, 16 μ L de IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) a 0,5 M, 40 μ L de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) a 40 mg/mL. Com a ajuda de esferas todo o material foi espalhado de maneira homegenia na superfície da placa. As placas foram incubadas invertidas a 37°C por 18 horas em estufa para o crescimento de colônias. No final foram feitas duas placas MF₁ com 100 μ L e a MF₂ com 50 μ L de colônias eletroporadas.

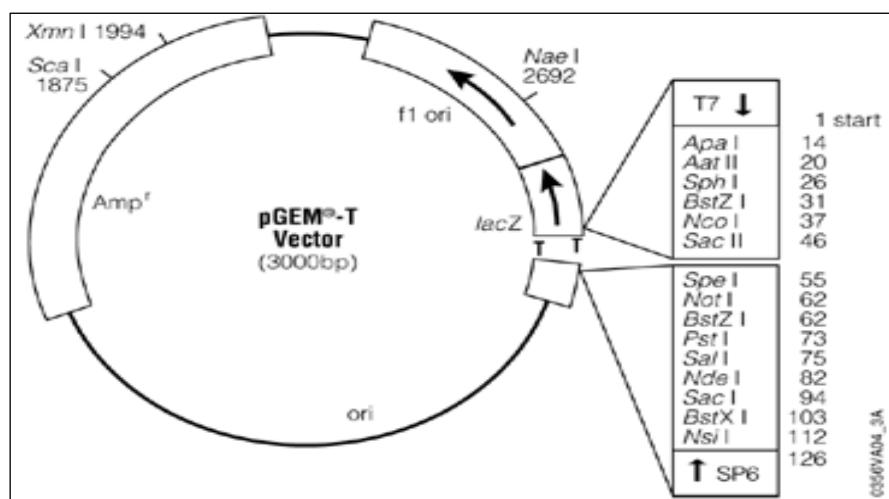


Figura 13 – Representação do vetor de clonagem pGEM-T. **Ori** = origem de replicação; **Lac Z** = α-peptídeo -região codificadora da enzima β-galactosidase; **T7** e **SP6** = promotores da RNA polimerase que flanqueiam uma região múltipla de clonagem; **T** = local de inserção da molécula de DNA exógena; **f₁ ori** = região f₁fago; **Amp^r** = gene que confere resistência a ampicilina.



Figura 14 – Cuba de eletroporação utilizada no processo de transformação bacteriana.

5.4.8. Seleção de Clones Positivos para SSR

A atividade do gene da enzima β -galactosidase foi um dos critérios utilizados para avaliar a seleção dos clones. As colônias brancas (recombinantes) possuem esse gene inativo e não produzem a enzima que cliva o X-gal expressando uma cor branca, consideradas assim como oriundas da ausência de degradação do substrato cromogênico, portanto sendo dito positivo. Os clones não recombinantes possuem esse gene ativo sendo capazes de transcrever e traduzir a enzima, o que torna as colônias azuis sendo fáceis de identificarem na placa de petri, considerados a partir deste conhecimento negativos.

Logo após a análise das duas placas feitas, o resultado não apresentava colônias azuis e tinha um alto índice de colônias o que atrapalhava o processo de repicagem sendo necessário fazer mais duas placas com 50 μ L e 25 μ L de transformação melhorando o processo de repicagem e seleção das colônias bacterianas.

Para garantir que cada construção (vetor + fragmento) fosse mantida em condições apropriadas para análise posterior, foram utilizadas placas *DeepWell* com fundo em U, com 80 μ L por poço de meio LB contendo ampicilina (100 μ g/ml). As colônias brancas foram repicadas com a ajuda de palitos estéreis acondicionados em tubos falcon. As placas foram vedadas com um plástico apropriado, furado em cada poço para entrada de ar e oxigenação do ambiente, incubadas a 37°C overnight em estufa para o crescimento de colônias (Figura 15). Após esse período as placas foram armazenadas em freezer -20°C por 30 minutos.

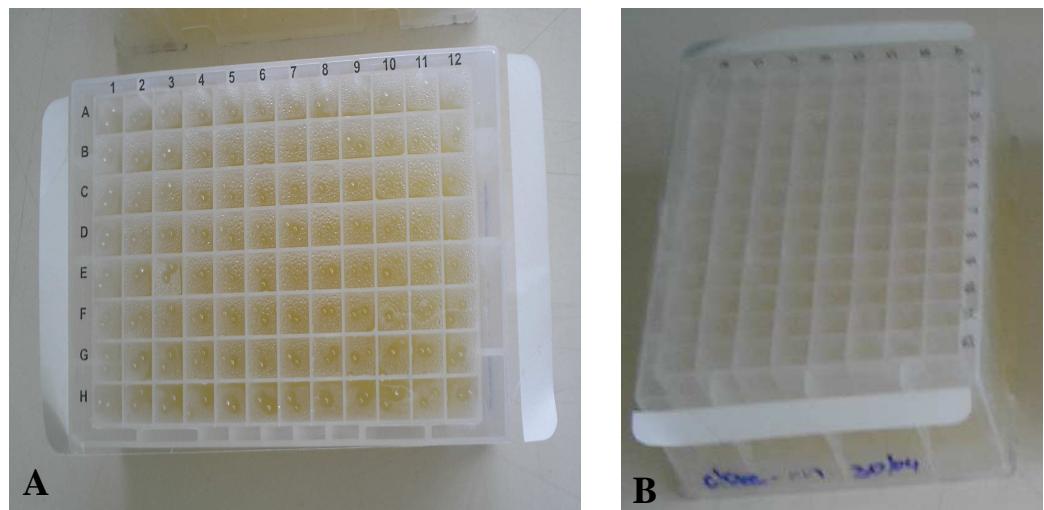


Figura 15 - Placa DeepWell com fundo em U. **(A)** Vista superior da placa. **(B)** Vista basal da placa.

5.4.9. PCR dos insertos

Com o objetivo de identificar os clones contendo microssatélites e verificar a eficiência do procedimento de enriquecimento e clonagem, os clones positivos identificados na hibridização foram diluídos em 80 μ l de água ultrapura estéril e expostos a 95°C por 5 minutos. Logo em seguida foi realizada uma reação de amplificação dos insertos diretamente das colônias obtidas na etapa anterior, utilizando o primer *M13F* e *M13R*. Esta suspensão de células foi utilizada em uma reação com volume final de 10 μ L por tubo contendo as seguintes concentrações dos reagentes: 1,0 μ L de tampão 10X (50 mM KCl; 10mM de Tris-HCl, pH 8,9) na concentração de 1,5 mM, 0,06 μ L de MgCl₂ (2,5 mM), 0,6 μ L de dNTP (2,5 mM), 0,12 μ L de *M13F* e *M13R* (10 mM), 0,2 μ L de *Taq* DNA polimerase (5 U/ μ L), 0,8 μ L de BSA, 1 μ L de DNA utilizado da diluição das colônias, totalizando um volume final de 10 μ L. Foi feito um mix para 96 reações. Esta reação foi submetida a um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos (94 °C/1 minuto, 56 °C/1 minuto, 72 °C/1 minuto) e um passo final de extensão a 72 °C por 7 minutos. Para controle, 2 μ L do volume da reação de PCR e 2 μ L de tampão de carregamento foram utilizados na eletroforese em gel de agarose 2% (Figura 16).

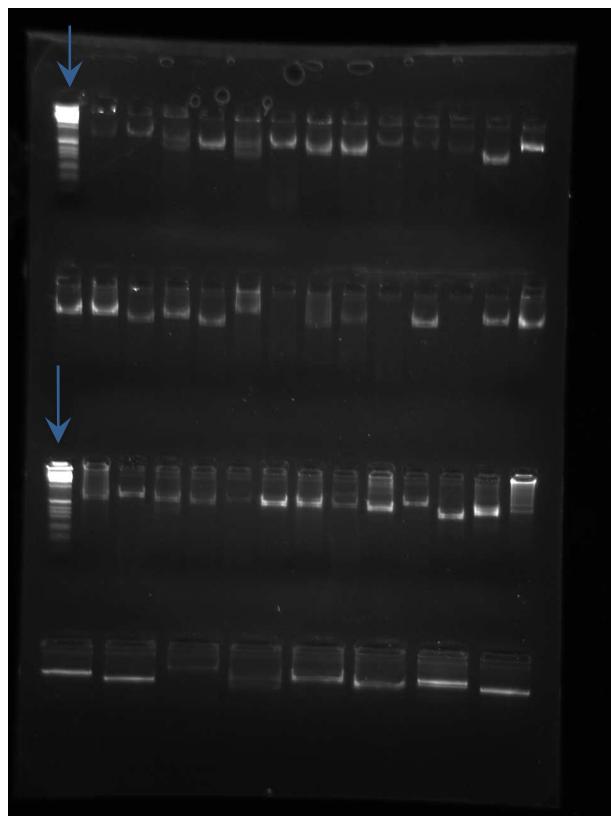


Figura 16 – Resultado da eletroforese (quantificação pré-reação de sequenciamento) da PCR das amostras de inserto. As setas em azul indicam o marcador Ladder 1Kb. Foram feitas 3 fileiras com 14 poços cada e uma fileira com 8 poços.

5.4.10. Reação de Exo/Sap

A reação de PCR faz uso de dois *primers*, dNTPs e DNA polimerase para produzir múltiplas cópias de uma sequência de DNA específica. Quando a reação termina a maior parte dos *primers* e dNTP permanece intacta, e, se não retirados, irão interferir no sequenciamento. As enzimas Exonuclease I (Exo I) e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) removem estes materiais indesejados (Figura 17). Depois deste procedimento o sequenciamento é feito normalmente.

Nesta reação foram utilizados 5 μ L do PCR de inserto, 2 μ L do mix de Exo/Sap com as enzimas Exo na concentração de 10U/ μ L e a SAP 1U/ μ L. Foram adicionados 26,1 μ L de tampão tris 50 mM pH 8,0 e permaneceram na programação de 37°C por 30 minutos e 80°C por 20 minutos no termociclador. Logo em seguida a reação foi deixada a 4°C por 60 minutos.

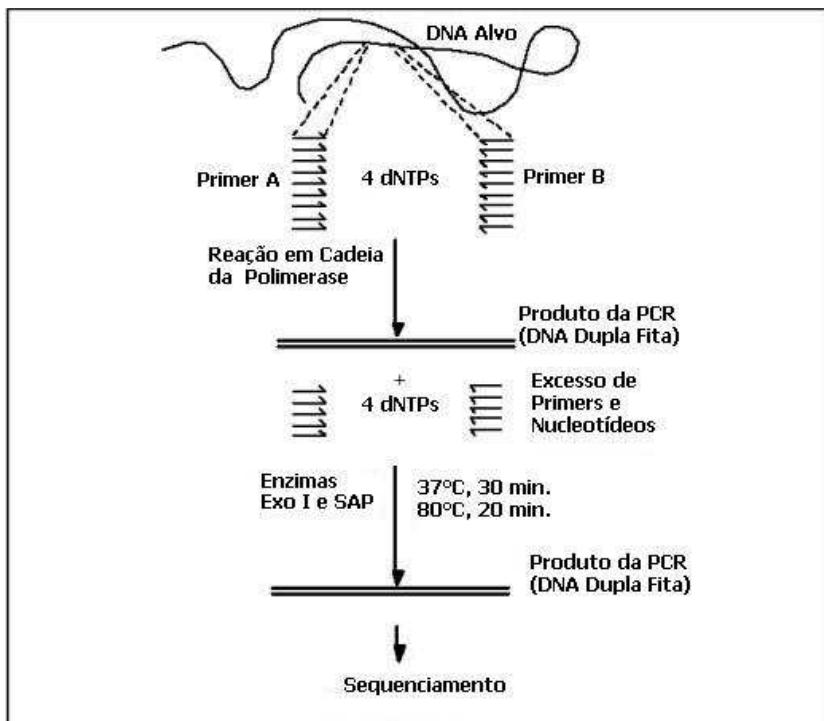


Figura 17 – Esquema da reação de ExoSap utilizada no processo.

Fonte: <http://www.icb.ugmf/ibem/protocolos/exosap.html>

5.4.11. PCR e reação de sequenciamento

Segundo Applied Biosystems, (2001) o sequenciador automático de DNA ABI Prism® 3700 Genetic Analyzer, dispõe de um sistema de 16 capilares que injetam uma carga eletrostática nas amostras que migram através dos capilares de um pólo negativo até o pólo positivo localizado no final do capilar, encerrando a corrida eletroforética realizada em polímero *POP Version 6* (Applied Biosystems®). Os capilares dispõem de uma janela de detecção acoplada a um sistema de laser e a uma câmera. O feixe de raios laser, ao passar pela janela atravessando os capilares, incita as bases marcadas que produzem um comprimento de onda característica de cada base específica (A, T, C ou G). O comprimento de onda é então detectado pela câmera que transmite a informação ao computador acoplado ao seqüenciador. Este computador dispõe de um software, *Data Collection®* (Applied Biosystems®), que controla as operações do seqüenciador, bem como coleta e interpreta os dados produzidos. Os resultados coletados são posteriormente analisados pelo software *Sequence Analysis®* (Applied Biosystems®) responsável pela produção de um eletroferograma, que é representativo da sequência de bases detectadas nas amostras. O eletroferograma é visualizado pelo aplicativo *Chromas*, que também pode traduzir o eletroferograma em um arquivo *.txt (*nome da amostra) em formato FASTA. O formato FASTA é um formato de texto padrão utilizado para submissão de sequência a diversos programas de bioinformática,

como por exemplo, o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990). O tamanho do capilar utilizado neste trabalho foi o de 50 cm, que sequencia até aproximadamente 500 bases por corrida.

As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o Kit de sequenciamento *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) para o modelo *ABI 3700 da Applied Biosystems* (Figura 18). O produto foi amplificado seguindo os seguintes volumes para a amplificação dos fragmentos via PCR: 0,5 μ L de *primers* M13F (3,2 ng/ μ L), 1 μ L do template da exosap ; e 1 μ L do *BigDye* o qual possui uma marcação fluorescente que evidenciou o processo, 1,5 μ L de tampão do kit de sequenciamento 5x, 6 μ L de água, totalizado 10 μ L de reação final por amostra. Foram realizadas 18 reações para este sequenciamento. As amplificações foram feitas utilizando um termociclador nas seguintes condições: 94°C por 2 minutos, 30 ciclos com etapa de desnaturação (94°C por 10 segundos); hibridização (50°C por 10 segundos) e de extensão (60°C por 4 minutos) conforme recomendação do fabricante.

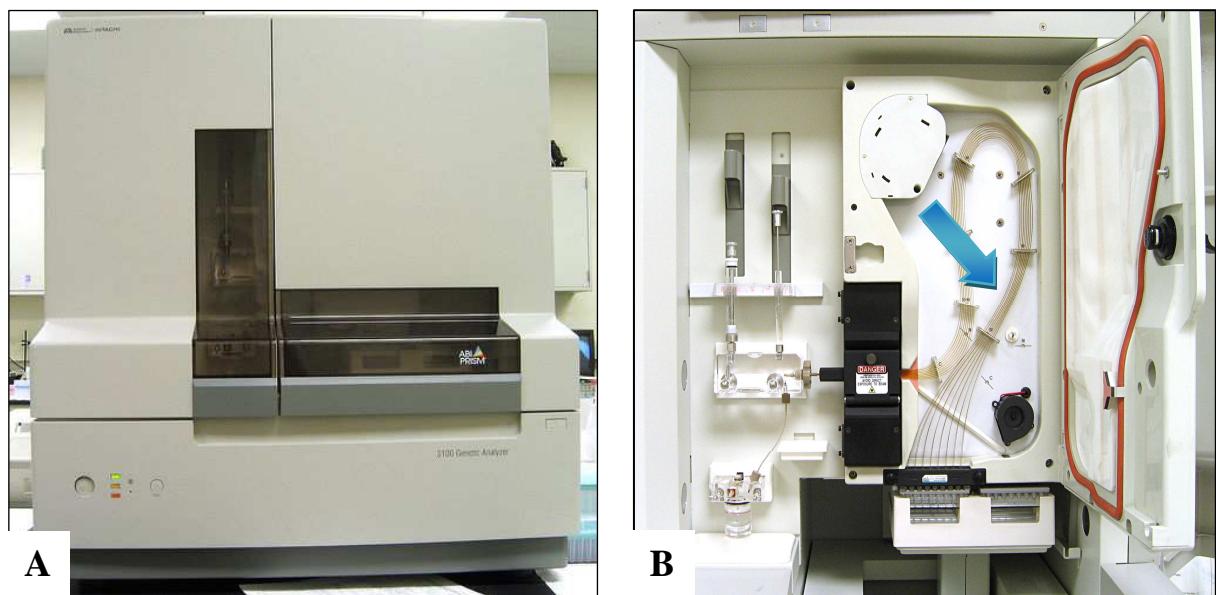


Figura 18 – (A) Sequenciador de DNA capilar ABI 3700 da Applied Biosystems **(B)** Área interna do sequenciador denotando os capilares (seta azul).

Os produtos das amplificações foram purificados seguindo o protocolo do Kit de sequenciamento, foram inseridos 2,5 μ L de EDTA (125 mM), 25 μ L de etanol absoluto e selado com tampa plástica aderente. O material foi misturado e invertido quatro vezes e incubado a 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foi centrifugado a 30 minutos (3.000 rpm) a 4°C e toda a fase líquida foi retirada imediatamente por inversão. Após, dado um spin foi com a placa invertida e protegida com papel toalha até 180 rpm; foram

adicionados 50 μ L de etanol 70% (tampada com o mesmo adesivo); centrifugada a 4°C por 15 minutos (1650 rpm) e todo o etanol foi retirado invertendo a placa; dado um spin com a placa ainda invertida por 1 minuto a 180 rpm. A placa foi posta aberta pra secagem a 15°C no termociclador protegida da luz e posteriormente deixada à temperatura ambiente.

Ao ser levada ao sequenciador, foram inseridos 9 μ L de formamida, e o material desnaturalizado a 95°C por 5 minutos e colocado no gelo para um choque térmico e a completa desnaturação do DNA.

5.4.12. Desenho dos iniciadores

Os eletroferogramas produzidos pelo sequenciador foram analisados e editados através do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (versão 5.0.9) criado pelo Prof. Tom Hall do departamento de microbiologia da Universidade do Estado da Carolina do Norte (USA) onde cada sequencia foi conferida visualmente concatenando-se as sequencias dos *primers forward* e *reverse* de cada amostra e seu respectivo alinhamento e selecionando sequências repetidas in tandem com um, dois ou três nucleotídeos (Hall, 1999).

O próximo programa utilizado foi o *STADEN* (Staden, 1996), para obtenção da fita consenso para posterior desenho de *primers*, cuja função foi desenhar os pares de *primers* complementares às sequências de DNA que flanquearam os microssatélites presentes na amostra. Foram especificados alguns parâmetros para o desenho dos pares de *primers* no programa *STADEN* (Tabela 6).

Tabela 6 - Parâmetros específicos selecionados para os desenhos dos *primers* SSR no Programa *STADEN*.

Classe	Parâmetro		
Temperatura de hibridização	mínimo: 56°C	ótimo: 60°C	máximo: 63°C
Quantidade de GC no primer	mínimo: 30%		máximo: 70%
Tamanho do produto	mínimo: 100pb		máximo: 300pb

A tabela 7 a seguir contém a relação dos 30 *primers* fabricados e utilizados no processo de validação, descrevendo o tamanho do fragmento, a sequencia *forward* e *reverse* e as unidades de base que compõe os *primers*.

Tabela 7 – Relação dos 30 *primers* desenhados para o teste de validação

Nome	Microssatélite	Tamanho Fragmento	Primer Foward	Primer Reverse
MF 1	(GA)15	219	AATTCGATTCAAGCCTAGAGCC	CTTCCTCTCCCTTCCCAATC
MF 2	(GA)19	110	TCACCGATCTAACTTGACCAAA	TCTTTCTCTCTTGAACCCAC
MF 3	(GA)19	110	TCACCGATCTAACTTGACCAAA	TCTTTCTCTCTTGAACCCAC
MF 4	(AG)11 (AG)7 (AG)6 (AG)6	205	GAAGATAATGAGGGCTCTGGA	TCTTCCATCTCTCTCCCTC
MF 5	(AG)23	169	AATTCGATTCAAGCCTAGAGCC	CTCCCTATCTTCTCTGCCCC
MF 6	(GA)11 (GA)13	234	AATTCGATTCAAGCCTAGAGCC	TTTCCCTACCTCAGTCACCC
MF 7	(GA)17	361	TACGACTCACTATAGGGCGAA	CCCGATCTCTTCTCTCTCTT
MF 8	(AG)23	163	ACCGATCATGGTGGTAGAACTC	AATTCAACGATCAAACCCCC
MF 9	(AG)19	143	ATACATCGCGCATATCTCACTG	ATTCACACTCCCTACTAGA
MF 10	(AG)8	178	AATTCGATTCAAGCCTAGAGCC	CCCTTCTCTCTCGCTTACT
MF 11	(AG)17	135	AGAGATTGGGGAGGGGAAG	TCTCCCTCTCTTCTGTTGTC
MF 12	(GA)7 (GA)8	158	AAACCGAGAGAGAGGGAGAAAG	CTCGTCTGATTCCTCTTCCCTG
MF 13	(GA)14	333	CTAGAGAGGGAGGAGAAGGGAG	TACTCAAGCTATGCATCCAACG
MF 14	(AGA)11	232	CGGGATAGGAGGTTCACTGTAG	CTCCACCTCTTGTCTGATTCC
MF 15	(AG)11	261	TCGACGAAGATGAAGAATAGGG	CGAATTCAACCGATCTACTCCTC
MF 16	(AG)7 (GA)10	182	CTGACAAGGTGGCTACGTTT	ACCTCCTCTTCCCTATTCCCT
MF 17	(AG)7 (AG)8	191	AGGGCTTCTGGAAGTGTCAAG	TCCCTCTCTCTCCCTTGT
MF 18	(CT)16	178	ATCATCGAAGTTCATCCATCA	CAGAGGGAAATGAACACAGAGA
MF 19	(AG)18	248	AATTCGATTCAAGCCTAGAGCC	ATCACCGAGCATTCCCT
MF 20	(GA)8	108	GTGGGGAGGAATACGAGGA	ATCTATCTCCCTCTCTGCC
MF 21	(AGA)10	182	GGTCGTTAGGTGGTAGGTG	CCTCCTCTTCTCGTCTCT
MF 22	(AG)14 (GA)6	190	AGGGGAGGACATAGAGGAAGAG	TGTATGTGAGGACGAAGGAGAA
MF 23	(GA)16	173	GATTGTGGGTCAAGTACAAG	TATCTCTCTACCCCTCG
MF 24	(GA)10	253	AATGGAGGTTAGTTGGAGTT	GATCTCTTATCTCTCTATCTCTC
MF 25	(GA)18	273	AATTCAACCGATCAGGGAGG	CGATCTCTCTTCTCTTCTCC
MF 26	(GA)13	146	TAGTGAACCGAGAGAGAGAGGG	CTCCCTCTGAGATTCCCTCC
MF 27	(AG)6 (GA)12	129	TGGCACACAATAAAATCGAGAG	TCTGAGCTCTCTTCCCTCCT
MF 28	(CT)9	174	ACCGATCGTTAATGACCTCTGT	ACCATGATTACGCCAAGCTATT
MF 29	(GA)8 (GA)9	176	GATCGGGTGAGGAATTGAG	CTCTCTCTCTCCCTCTCGGAT
MF 30	(GA)9	159	GATCGGGAGGAGACAGTGG	TTGTCTTGTCTCTCTCGCC

5.4.13. Otimização e validação dos locos SSR

Neste trabalho, 160 regiões microssatélites foram desenvolvidas para a espécie, sendo que apenas 30 pares de *primers* (*forward* e *reverse*) foram desenhados, sintetizados e testados. Os iniciadores sintetizados foram testados em uma série de reações de PCR utilizando DNA de 2 populações selecionadas na APA-Pandeiros, totalizando 26 indivíduos de *Mauritia flexuosa*, a fim de se obter a temperatura de hibridização ideal para cada par de iniciadores. Assim, foram testadas temperaturas que variaram entre 48 e 62°C. A reação de PCR consistiu da seguinte combinação de reagentes: 3 μ g de DNA, tampão de PCR 1x (10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 a 7,5 pmol de iniciadores, 200 μ M de dNTP, 1 U

de Taq DNA polimerase e água ultrapura. As amplificações foram padronizadas, variando a temperatura de hibridização e as concentrações de MgCl₂, DNA molde, dNTP e enzima.

Para a reação foi utilizado o seguinte programa no termociclador Applied Biosystems 9700: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C 1 minuto, temperatura de hibridização em teste por 1 minuto, (48°C a 62°C) por 1 minuto e extensão de 72°C por 1 minuto. A temperatura de hibridização era variada de modo a aumentar a especificidade e eficiência de hibridização de cada par de *primer* e 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A partir dos resultados das amplificações, as detecções de polimorfismo foram realizadas em géis desnaturantes de poliacrilamida 5% de alta resolução corados com nitrato de prata (Creste *et al.*, 2001).

Primeiramente todos os 30 iniciadores foram testados na forma de gradiente com uma única temperatura de anelamento e posteriormente testados variando as temperaturas de 2°C em 2°C até que fossem acertadas.

Após uma baterias de testes de validações dos *primers* sintetizados, apenas 6 foram considerados polimórficos para análises genéticas com buriti (Tabela 8). Os outros *primers* mostraram-se monomórficos ou com hibridizações inespecíficas.

Utilizando os *primers* validados, duas populações com uma distância média de 40 km entre uma população e outra, foram utilizadas na tentativa de verificar a veracidade do anelamento e geração do polimorfismo. As populações eram do município de região de Januária – MG das regiões de Pindaíbal e Vila.

Tabela 8 – Relação dos *primers* validados que apresentaram polimorfismo para *M. flexuosa*.

Nome	Microssatélite	Amplitude Alélica (pb)	Tm	Número de Alelos
MF03	(GA) ₁₉	101 a 209	56°C	29
MF08	(AG) ₂₃	107 a 155	56°C	18
MF11	(AG) ₁₇	101 a 241	48°C	17
MF12	(GA) ₇ (GA) ₈	103 a 223	48°C	29
MF17	(AG) ₇ (AG) ₈	103 a 213	56°C	26
MF18	(CT) ₁₆	113 a 213	56°C	20

5.5. Metodologia de análise estatística dos dados

5.5.1 - Estimativa das frequências alélicas

As frequências alélicas descrevem a variação para cada loco e suas estimativas foram obtidas pelo software *Population Genetic Analysis (PopGene) Versão 1.31* (Yeh & Boyle, 1999) por meio da contagem direta do número de alelos por loco, dividido pelo número de alelos no loco (Nei & Kumar, 2000).

$$\hat{P}_{ij} = \frac{n_{ij}}{n_j}$$

Em que:

p_{ij} - frequência do alelo i na população j;

n_{ij} - número de ocorrência do alelo i na população j;

n_j - número total de alelos amostrados na população j.

5.5.2. Estimativa do tamanho dos fragmentos

A determinação do tamanho dos fragmentos alélicos foi feita diretamente no gel utilizando o programa *Biorad Quantity One Versão 4.6.3*, o qual foi capaz de medir corretamente o tamanho dos fragmentos comparativamente com o valor do peso molecular estabelecido (Figura 19).

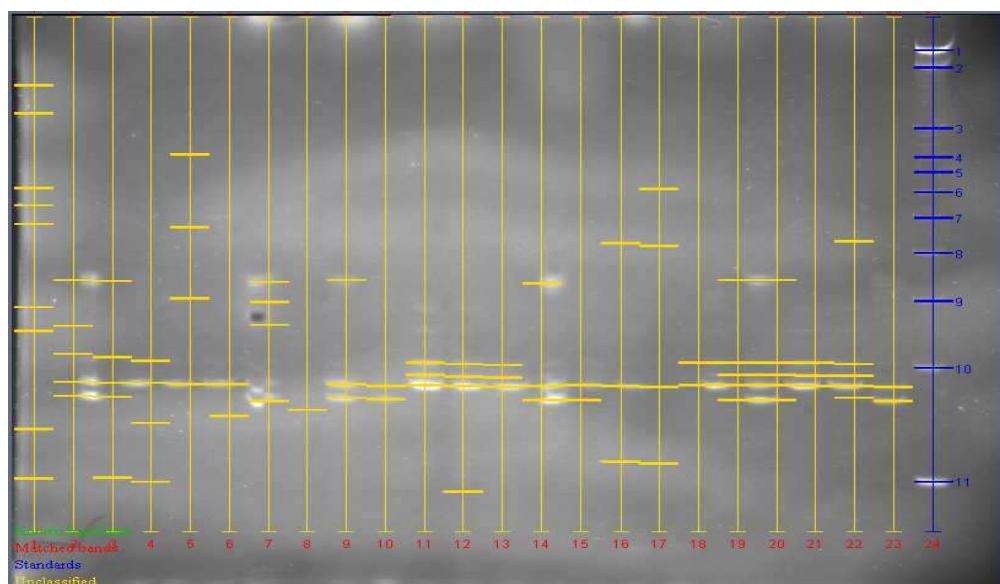


Figura 19– Screen do tamanho dos fragmentos (MF18) do gel de poliacrilamida a 5% feito pelo programa *Biorad Quantity*.

Os fragmentos dos alelos de interesse foram marcados pelo programa na cor amarela com um traço na horizontal, o traço em amarelo na vertical indica a coluna de aplicação. Com relação ao peso molecular, seus níveis foram marcados com um traço azul na horizontal sendo a coluna marcada com um traço na vertical também na cor azul. Na avaliação dos fragmentos é possível ver que os alelos de interesse foram marcados pelo programa entre as regiões de 100 pb (número 11 do ladder em azul) e 300 pb (número 9 do ladder em azul). Alguns alelos foram marcados a partir de 300 pb mas foram considerados inespecíficos.

5.5.3 - Estimativa dos índices de diversidade genética

A partir das frequências alélicas foram obtidos os seguintes índices de diversidade genética: porcentagem de locos polimórficos (P), número médio de alelos por loco (A), heterozigosidade média observada (H_o), heterozigosidade média esperada ou diversidade gênica (H_e) de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, número observado de alelos (na), número efetivo de alelos (ne) e índice de fixação (f) (Berg & Hamrick, 1997).

Esses índices foram obtidos utilizando-se o programa *Population Genetic Analysis (PopGene) Versão 1.31*.

a) Porcentagem de locos polimórficos (P): Um loco é considerado polimórfico quando a frequência de seu alelo mais comum não exceder 0,95 ou 0,99. Usa-se o critério 0,95 quando o tamanho amostral é menor que 50 indivíduos, e para amostras que excedem 50, usa-se o critério 0,99 (Lewontin, 1972). Esta medida é obtida pela média aritmética do número de locos polimórficos pelo número total de locos.

b) Número médio de alelos por loco em cada população (A): O número médio de alelos por loco (A) em cada população foi obtido pela divisão do número total de alelos pelo número total de locos. Esta estimativa fornece uma idéia da distribuição dos alelos nas diferentes populações estudadas.

c) Heterozigosidade média observada (H_o): Para se obter a heterozigose média observada, as proporções obtidas para cada loco foram somadas e divididas pelo número total de locos analisados.

$$\hat{H}_o = 1 - \sum P_{ii}$$

Em que:

H_o - estimativa da heterozigose observada;

P_{ii} - frequência dos genótipos homozigotos.

d) Heterozigosidade média esperada (H_e): A heterozigosidade esperada para cada loco, em uma dada população, foi obtida a partir das frequências alélicas, segundo as frequências genotípicas esperadas, conforme equilíbrio de Hardy-Weinberg, de acordo com Nei (1987).

$$\hat{H}_e = 1 - \sum P_i^2$$

Em que:

H_e - estimativa da heterozigose esperada;

n - número de indivíduos amostrados na população em questão;

p_i^2 - frequência alélica estimada do i -ésimo alelo.

e) Índice de Fixação Wright, 1978 (Fis) – O coeficiente, que mede a correlação entre os alelos nos gametas que formaram um zigoto (Wright, 1931), foi obtido por loco e pela média dos locos, a partir das seguintes relações:

$$\hat{f} = 1 - \frac{\hat{H}_o}{\hat{H}_e} \text{ (locos)}$$

$$\hat{f} = 1 - \frac{\sum \hat{H}_o}{\sum \hat{H}_e} \text{ (média dos locos)}$$

Em que:

f - estimativa do índice de fixação de Wright;

H_e - estimativa da heterozigose esperada;

H_o - estimativa da heterozigose observada.

Este coeficiente permite acessar os níveis de fixações alélicas, informando o grau de endogamia dentro das populações. Para esta estimativa, foram estabelecidos intervalos de confiança a 95% de probabilidade, utilizando-se o procedimento de *bootstrap* com 10.000 repetições (Weir, 1996).

f) Outros dados também foram analisados como número observado de alelos (*na*) e o número efetivo de alelos (*ne*).

5.6. Transferibilidade para a espécie *Orbignya oleifera* (Burret)

Espécies filogeneticamente próximas podem apresentar homologia em sequências flankeadoras aos locos SSR permitindo a transferibilidade (Grattapaglia *et al.*, 1998).

A espécie *O. oleifera*, de alto potencial de extração e utilização econômica pertencente a mesma família do buriti (Arecaceae). Segundo Grattapaglia *et al.*, 1998, a transferibilidade de *primers* entre espécies correlacionadas vem se desenvolvendo e demonstra certa eficiência no processo o que pode contribuir para o estudo da estrutura genética bem como outras pesquisas relacionadas.

Estudos de transferibilidade já foram realizados de espécies como *Eucalyptus* (Brondani *et al.*, 1998), para indivíduos da família Meliaceae (White & Powell, 1997) e de *Eucalyptus spp.* para *Eugenia dysenterica* (Zucchi, 2002) e confirmam a eficiência da transferibilidade.

A reação de PCR para este teste de transferibilidade consistiu da seguinte combinação de reagentes: 3 ng de DNA, tampão de PCR 1x (10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 a 7,5 pmol de iniciadores (*forward* e *reverse* otimizados), 200 μM de dNTP, 1U de Taq DNA polimerase e água ultrapura.

Cada um dos seis *primers* validados foi testado numa mesma população, sendo que após a verificação de polimorfismo nos, outras populações foram testadas. A finalidade desta transferibilidade neste trabalho foi comprovar a eficácia dos iniciadores em espécies correlacionadas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Desenvolvimento de bibliotecas enriquecidas com locos microssatélites

No teste de digestão enzimática das três enzimas testadas (MseI, Sau3A, e Tsp509) Sau3A foi a que mostrou melhor eficiência na digestão do DNA genômico produzindo o perfil adequado de fragmentos (200 a 800 pb) para a construção da biblioteca (Figura 7) o que pode ser confirmado na eluição dos fragmentos de acordo com a Figura 9B.

A ligação dos adaptadores foi importante para garantir que cada fragmento tivesse uma terminação comum e conhecida. A utilização da biotina e dos oligos (TC)₁₄, juntamente com as contas se mostraram eficientes na separação magnética dos fragmentos contendo as regiões microssatélites.

Com relação ao resultado da PCR para o controle do enriquecimento da biblioteca, o mesmo foi satisfatório neste objetivo, não demonstrando perda de DNA nas lavagens, o que ficou evidente na análise dos tubos 3, 4, 5 e 6 na Figura 11.

A reação de exosap utilizada no desenvolvimento dos marcadores apresentou um bom rendimento na exclusão do excesso de *primers* e fragmentos de DNA que poderiam danificar o processo de sequenciamento e causar queda na sua qualidade, o que pode ser comprovado com o excelente sequenciamento realizado.

No processo de seleção dos clones positivos, algumas placas foram incubadas com um tempo um pouco maior a fim de garantir que as colônias azuis (que não receberam o inserto) evidenciassem, sendo assim não sequenciados falsos positivos.

Na primeira reação de transformação de células competentes *E. coli* XL1-Blue (Figura 20) com a ligação do fragmento de DNA ao plasmídeo obteve-se uma eficiência média de 95%.

De duas placas que foram semeadas contendo 25 µL de NZY + ampicilina, IPTG e Xgal, a placa 1 continha um total de 2.428 colônias sendo 91 colônias azuis, (3,74%). A placa 2 continha um total de 3.280 colônias sendo 148 azuis (4,51%).

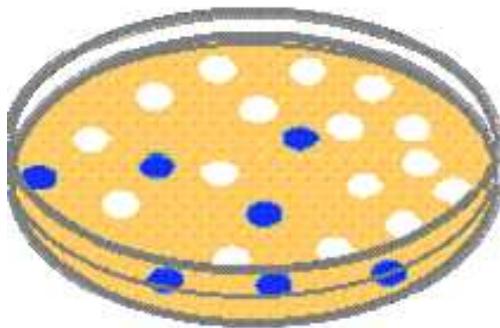


Figura 20 – Representação de uma placa de petri contendo as bactérias *Escherichia coli* XL1-BLUE transformadas. As colônias brancas estão representando os indivíduos positivos (que receberam o inserto corretamente) e as azuis os indivíduos negativos (que não receberam os insertos).

6.2. Enriquecimento e reenriquecimento da biblioteca genômica de microssatélites

Após o primeiro sequenciamento no ABI 3700, os resultados demonstraram ter encontrado 30% de regiões microssatélites dos 96 insertos seqüenciados, necessitando de um reenriquecimento do processo na tentativa de melhorar a resposta na procura das regiões SSR, as quais com este valor foram considerados insuficientes. Diante disso, mais placas foram cultivadas e o processo foi otimizado de forma eficiente. Após todo o processo de reenriquecimento, as novas placas foram sequenciadas.

O enriquecimento de bibliotecas genômicas é uma metodologia simples para o isolamento de microssatélites, sendo amplamente aplicado para uma grande variedade de espécies, porém com uma eficiência variável de recuperação de sequências contendo microssatélites (Butcher *et al.*, 2000; He *et al.*, 2003). Alguns relatos demonstram uma baixa eficiência, de 1,7% em batata (Ashkenazi *et al.*, 2001) e 2,1% em mamão (Santos *et al.*, 2003); outros relatos apontam para alta eficiência de enriquecimento, de 46% em *Lolium perenne* L. (Jones *et al.*, 2001) e de 28% em melão (Ristschel *et al.*, 2004). Já bibliotecas genômicas convencionais (sem enriquecimento) possuem uma baixa eficiência de recuperação de sequências contendo microssatélites. Em batata, por exemplo, Ashkenazi *et al.* (2001) relatam uma eficiência de 0,37% na recuperação de microssatélites utilizando esta abordagem.

6.3. Sequenciamento, análise das sequências e validação dos primers

Neste estudo, os resultados obtidos após o sequenciamento foram satisfatórios. No total, após o reenriquecimento foram analisados 576 clones positivos dos quais foram encontrados 160 regiões microssatélites (27,7%). Destas regiões, 30 foram selecionadas (18,75%) de acordo com os critérios (Tabela 8) para desenvolvimento dos iniciadores *forward* e *reverse*.

Dentre as 30 sequências analisadas algumas apresentaram motivos que foram classificados como perfeitos, compostos ou com sequências de dinucleotídeos e trinucleotídeos (Figura 21).

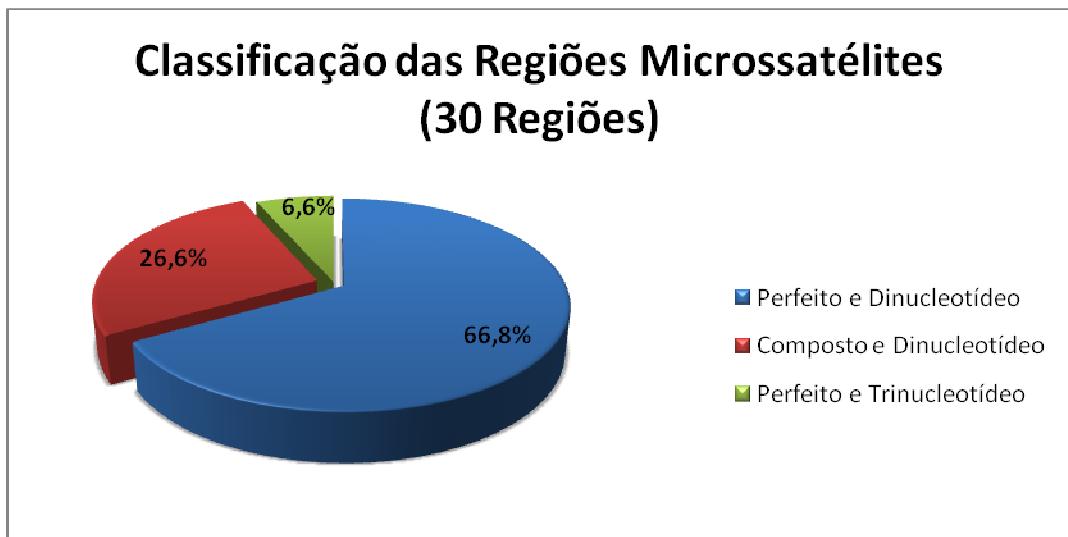


Figura 21 – Porcentagem dos motivos microssatélites perfeitos e compostos e as frequências de motivos dinucleotídeos e trinucleotídeos.

Esses resultados são interessantes, visto que microssatélites perfeitos são considerados, em média, como mais polimórficos do que aqueles com interrupções dentro dos motivos (Weber, 1990), fazendo com que se tenha preferência no isolamento e desenho de *primers* para este tipo de microssatélite (Ellegren, Primmer e Sheldon, 1995).

Com o auxílio do Bioedit os eletroferogramas foram analisados (Figura 22) e as sequências microssatélites classificadas. Por meio de ferramentas disponíveis neste programa foram retiradas das sequências as regiões correspondentes ao vetor e ao adaptador, restando apenas à sequência do inserto.

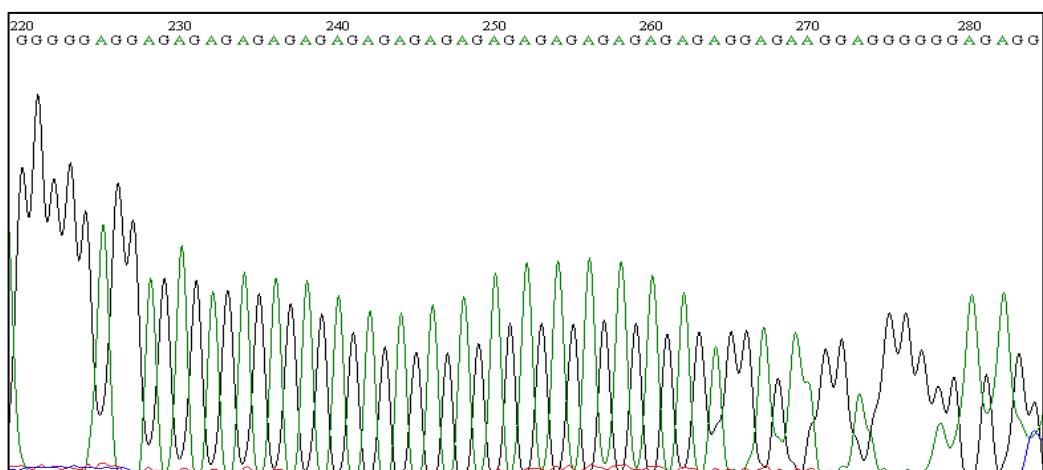


Figura 22 – Eletroferograma (MF9) contendo região microssatélite rica em AG do DNA de buriti (*M. flexuosa*).

A redundância pode ser atribuída à presença de clones duplicados pelo próprio procedimento da PCR durante as etapas de enriquecimento, além da presença de locos duplicados no genoma. Sequências com mais de 90% de similaridade foram consideradas redundantes, sendo que muitas delas apresentaram variações na composição de nucleotídeos. Paniego *et al.* (2002), adotaram critérios menos restritivos para analisar uma biblioteca enriquecida com microssatélites de girassol, utilizando similaridade $\geq 85\%$ para considerar as sequências como redundantes.

Dos 30 *primers*, analisando ambos (*forward* e *reverse*), 6,6% apresentaram redundância e 93,4% não apresentaram similaridade nas sequências (Figura 23), enquanto que analisando apenas os *primers forward*, 16,6% apresentaram redundância e 83,4% não mostraram haver similaridade (Figura 24). A análise apenas dos *primers reverse* não demonstrou haver redundância nas sequências. Nos *primers* validados não houve redundância entre as sequências.

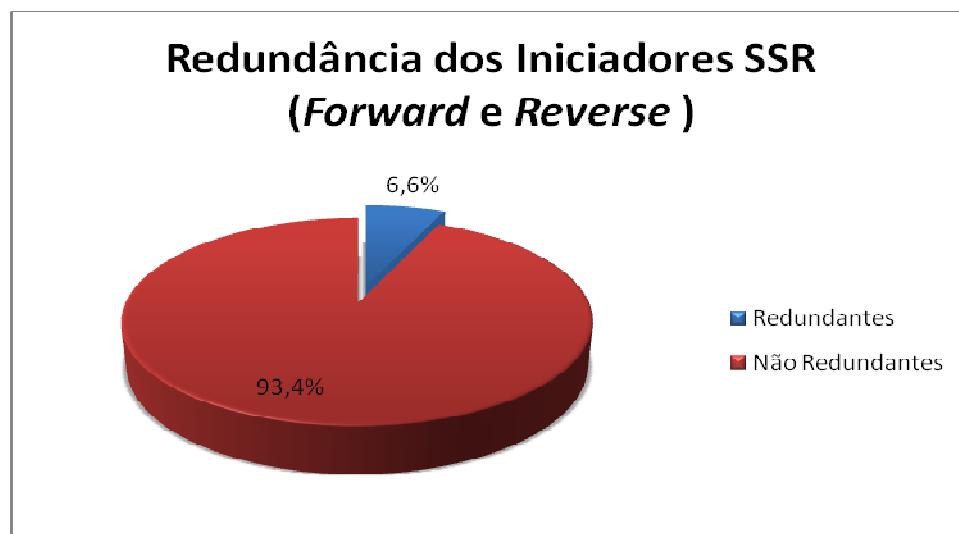


Figura 23 – Porcentagem de redundância nos *primers forward* e *reverse*.

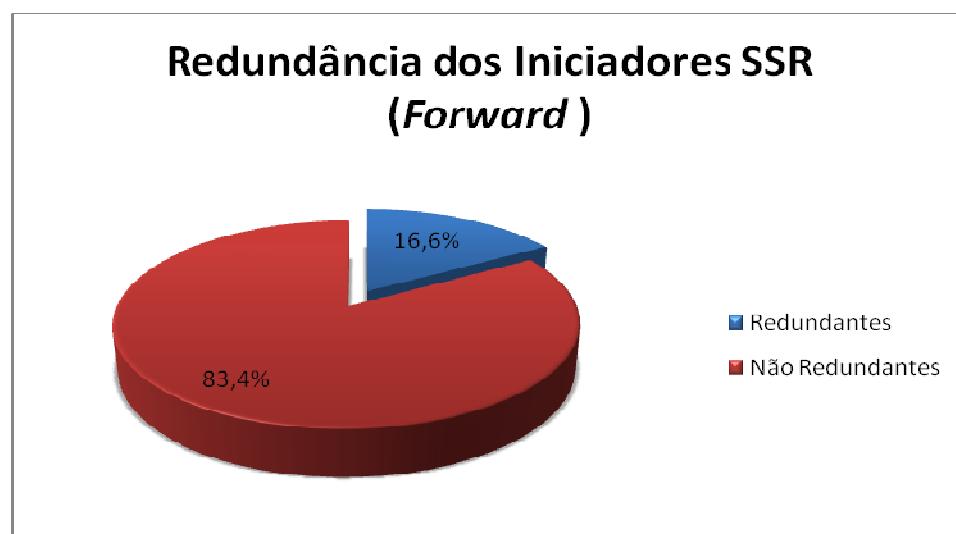


Figura 24 – Porcentagem de redundância nos *primers forward*.

Na análise das Figuras 23 e 24 é possível verificar que a redundância somente dos iniciadores SSR *forward* se apresentaram com maior porcentagem do que a redundância em ambos os iniciadores (*forward* e *reverse*).

Os motivos microssatélites mais frequentes encontrados nos trinta *primers* desenhados foram os dinucleotídeos AG e GA, outros motivos apareceram em porcentagem pequena, inferior a 10%, como AGA e CT (Figura 25).

He *et al.* (2003) construíram uma biblioteca genômica de amendoim e encontraram uma redundância de 67% das sequências de microssatélites. Já em *Lolium perenne* L., Jones *et al.* (2001) encontraram uma redundância de 16,4%, valor este próximo ao encontrado neste trabalho para os *primers forward*.

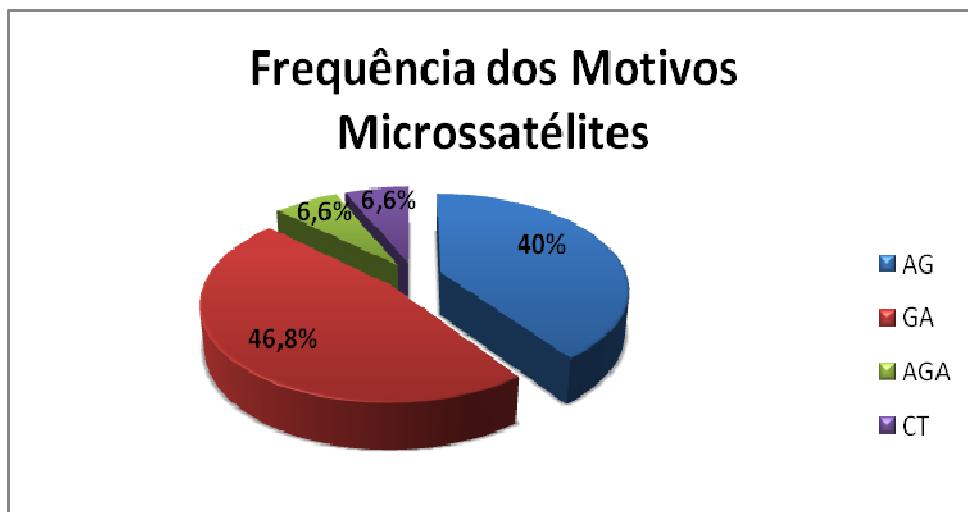


Figura 25 - Motivos microssatélites mais frequentes identificados em *Mauritia flexuosa*.

A frequência das classes de microssatélites é bastante variável em plantas (Wang *et al.*, 1994). Numa revisão feita por Powell, Machray e Provan (1996), estes autores relataram que os motivos AG são mais abundantes no genoma de plantas do que os motivos AC, diferentemente do que ocorre no genoma de mamíferos (Weissenbach *et al.*, 1992). Entretanto, ainda existe uma discordância sobre o assunto, uma vez que em algumas espécies os motivos AG são mais abundantes do que os AC (Brondani *et al.*, 1998; Varshney *et al.*, 2000) e, em outras, os motivos AC são mais frequentes (Echt e May-Marquardt, 1997; Bryan *et al.*, 1997; Butcher *et al.*, 2000).

Os fatores responsáveis pela diferença em abundância dos motivos dos microssatélites entre os vários gêneros em plantas ainda não são muito bem esclarecidos (Echt e May-Marquardt, 1997). Contudo, a escolha das enzimas de restrição pode influenciar no número e no tipo de repetição encontrados na construção das bibliotecas genômicas (Hamilton e

Fleischer, 1999). A construção de bibliotecas genômicas enriquecidas com microssatélites, também, tornou-se uma prática rotineira nos últimos anos em plantas (Zane, Bargelloni e Patarnello, 2002), sendo que a maioria delas utiliza sondas de dinucleotídeos, principalmente AG e AC, embora, alguns autores afirmem que os dinucleotídeos AT sejam os mais abundantes nos genomas vegetais (Primmer *et al.*, 1997). No entanto, os dinucleotídeos AT/TA são também instáveis em condições de PCR por formarem estrutura *hairpin*.

Considerando os 30 pares de *primers* desenhados e sintetizados, todos amplificaram corretamente. Destes, apenas 6 se mostraram polimórficos (MF3, MF8, MF11, MF12, MF17 e MF18), 24 amplificaram apresentando muitas bandas inespecíficas (MF16, MF14, entre outros) e monomórficas (MF7, MF16, MF15, entre outros).

Outros estudos envolvendo palmeiras, conforme Nucci *et al.* (2007), foram feitos visando o desenvolvimento de marcadores microssatélites para macaúba (*Acrocomia aculeata*). Neste estudo, de um total de 196 clones positivos, 174 (88,78%) tiveram pelo menos uma região microssatélite. *Primers* foram desenhados usando 77 (44,25%) sequencias e 36 (46,75%) foram sintetizadas e testadas. Oito pares de *primers* (22,22%) mostraram alto polimorfismo, os quais foram usados para avaliar geneticamente populações de macaúba. Neste estudo em macaúba foi utilizado na clivagem do DNA genômico a enzima *RsaI*, e no presente estudo, a *Sau3A*, por esta ter mostrado melhor eficiência na digestão do DNA genômico produzindo o perfil adequado de fragmentos (200 a 800 pb) para a construção da biblioteca. Comparativamente, neste estudo envolvendo o buriti, do total de 576 clones positivos foram encontradas 160 regiões microssatélites (27,7%), a partir das quais foram desenhados e testados 30 *primers* (18,75%). A partir destes iniciadores desenhados e testados, seis apresentaram polimorfismo (20%), valor este próximo do encontrado por Nucci *et al.* (2007) em macaúba.

6.4. Análise da Variabilidade Genética

6.4.1. Estimativa do tamanho e das frequências alélicas

O tamanho dos fragmentos encontrados variou de 101 pb (locos MF11 e MF03) até 241 pb (loco MF11). Em uma proporção média ocorrem 11,6 alelos por loco na população 1 e 11,5 alelos por loco na população 2.

Para a determinação da estimativa da variabilidade genética de *M. flexuosa*, foram obtidas as frequências de 24 alelos distribuídos nos seis locos polimórficos para as duas populações estudadas (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9 – Estimativa da frequência alélica na população 1 (Vila)

Alelo\Locos	MF3	MF8	MF11	MF12	MF17	MF18
Alelo A	0,0208	0,0417	0,0417	0,0208		
Alelo B	0,0208		0,1250			
Alelo C	0,0208	0,0417	0,0417		0,0417	
Alelo D	0,0833	0,1250		0,0208		
Alelo E	0,1875	0,0625		0,0417	0,0417	0,0417
Alelo F	0,0833	0,0833		0,0208		0,2083
Alelo G	0,0417	0,0833		0,0833		
Alelo H		0,3333		0,1042		
Alelo I		0,0625		0,1250		0,0833
Alelo J		0,0417	0,1250	0,0417		0,2292
Alelo K		0,0625	0,2083	0,0625		0,1875
Alelo L	0,0417	0,0417		0,0417	0,0417	
Alelo M	0,0417	0,0417	0,0417	0,1667		
Alelo N			0,1667			0,0208
Alelo O			0,0833		0,0417	0,0208
Alelo P			0,1250			0,0417
Alelo Q	0,0417		0,0833		0,0833	0,0417
Alelo R	0,0417		0,0833			0,0833
Alelo S	0,0625				0,1250	
Alelo T	0,0417			0,0833	0,1042	
Alelo U	0,0833				0,0833	
Alelo V	0,2500				0,0417	
Alelo X					0,2500	
Alelo Z					0,1667	

Na população 1, localizada na APA Pandeiros região da Vila, a partir da avaliação das frequências obtidas, alguns alelos foram apresentados como raros considerando que apresentam frequência menor que 0,05. Dentre os locos o MF11 apresentou o menor número de alelos enquanto o MF12 apresentou o maior número.

O loco MF3 apresentou 12 alelos, sendo que os de menor frequência (0,0417) foram os alelos G, L, M, Q, R e T e o alelo V o de maior frequência encontrado (0,2500). No loco MF8 foi encontrado um total de 13 alelos, sendo que os de menor frequência (0,0417) foram os alelos J, L e M e o alelo de maior frequência encontrado foi o alelo H (0,3333). No loco MF11 com um total de 10 alelos, a menor frequência foi de 0,0417 para os alelos A, C e M e uma frequência maior de 0,2083 para o alelo K. No loco MF12 com 14 alelos, foi encontrado alelos com frequência menor do que os outros locos como os alelos D e F (0,0208) e alelo com grande valor de frequência como o alelo M (0,1667). Já no loco MF17 a frequência menor encontrada entre os alelos foi de 0,0417 nos alelos E, L, O e V e a maior frequência foi vista no alelo X (0,2500). Por fim, o loco MF18 apresentou alelos com frequência mínima de 0,0417 como os alelos C, E, P, Q e com alta frequência como o alelo J (0,2292).

Tabela 10 – Estimativa da frequência alélica na população 2 (Pindaibal).

Alelo\Locos	MF3	MF8	MF11	MF12	MF17	MF18
Alelo A	0,0250	0,0500		0,0250		0,0250
Alelo B	0,0500		0,1500	0,0500	0,0500	
Alelo C	0,2000		0,1000	0,0250	0,0500	
Alelo D	0,0750		0,3000	0,2000	0,1250	0,0500
Alelo E	0,1250		0,1500	0,0250		
Alelo F	0,0250	0,0250	0,1000		0,0250	0,0500
Alelo G	0,0500		0,1000	0,0250	0,0250	
Alelo H	0,0750	0,2000			0,0250	0,0500
Alelo I	0,0250		0,1000	0,1000	0,2000	0,1500
Alelo J	0,1000				0,1000	
Alelo K	0,0250	0,3000		0,1000	0,0500	
Alelo L	0,0250			0,0250		0,2250
Alelo M	0,0250	0,2000		0,0500	0,0500	0,2250
Alelo N	0,0500			0,0750	0,0250	0,0500
Alelo O	0,0500				0,0500	0,0750
Alelo P	0,0500			0,0750	0,0250	0,1000
Alelo Q				0,0500		
Alelo R				0,1250		
Alelo S	0,0250			0,0500	0,1750	
Alelo T						
Alelo U						
Alelo V						
Alelo X					0,0250	
Alelo Z						

Na população 2 (Pindaibal) foram analisados os alelos distribuídos num total de seis locos alguns alelos foram apresentados como raros considerando que apresentam frequência menor que 0,05. Dentre os locos, o MF8 apresentou o menor número de alelos enquanto o MF3 apresentou o maior número.

O loco MF3 apresentou 17 alelos, sendo que os de menor frequência (0,0250) foram os alelos A, F, I, K, L e M e o alelo C o de maior frequência encontrado (0,2000). No loco MF8 foi encontrado um total de 5 alelos, o menor número encontrado na população e entre as duas populações, sendo o de menor frequência (0,0250) o alelo F e o de maior frequência o alelo K (0,3000). No loco MF11 com um total de 7 alelos, a menor frequência foi de 0,1000 para os alelos C, F, G e I e uma frequência maior de 0,3000 no alelo D. No loco MF12 o segundo a apresentar o maior número de alelos (15 no total) foi encontrado alelos com menor frequência (0,0250) como os alelos A, C, E, G e L e um alelo com grande valor de frequência como o alelo D (0,2000). No loco MF17 a frequência menor encontrada entre os alelos foi de 0,0250 (alelos F, G, H, N, P e X e I) e a maior frequência foi vista no alelo X (0,2000). Por fim, o loco MF18 apresentou um alelo com frequência mínima de 0,0250 (alelo A) e com alta frequência como os alelos L e M (0,2250).

Os locos mais polimórficos considerados foram o MF3 e MF12. Dentre os seis locos polimórficos encontrados, alguns amplificaram com temperatura média de 48°C (MF11 e MF12), enquanto que os outros quatro locos polimórficos avaliados amplificaram na temperatura de 56°C.

As frequências alélicas de cada loco estão representadas graficamente nas Figuras 26 e 27. Foram encontrados 139 alelos distribuídos entre os seis locos analisados nas duas populações, sendo encontrados 70 alelos na população 1 e na população 2, 69 alelos.

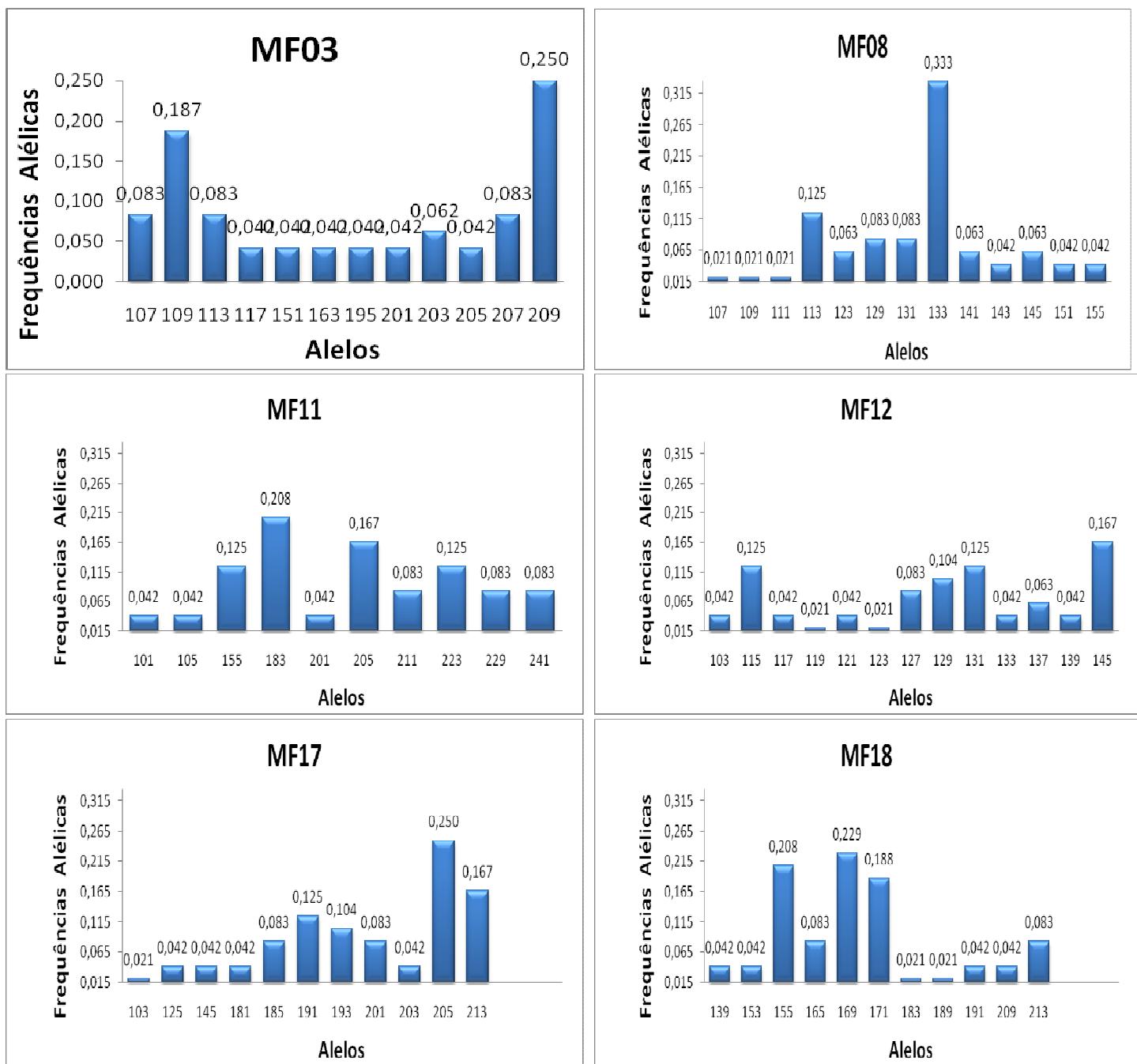


Figura 26 - Histograma das frequências alélicas dos seis locos microssatélites, estimados para 24 indivíduos da população 1 de *Mauritia flexuosa*. O eixo Y indica a frequência alélica e o eixo X indica o número do alelo, em pares de base. As respectivas frequências se encontram acima de cada coluna.

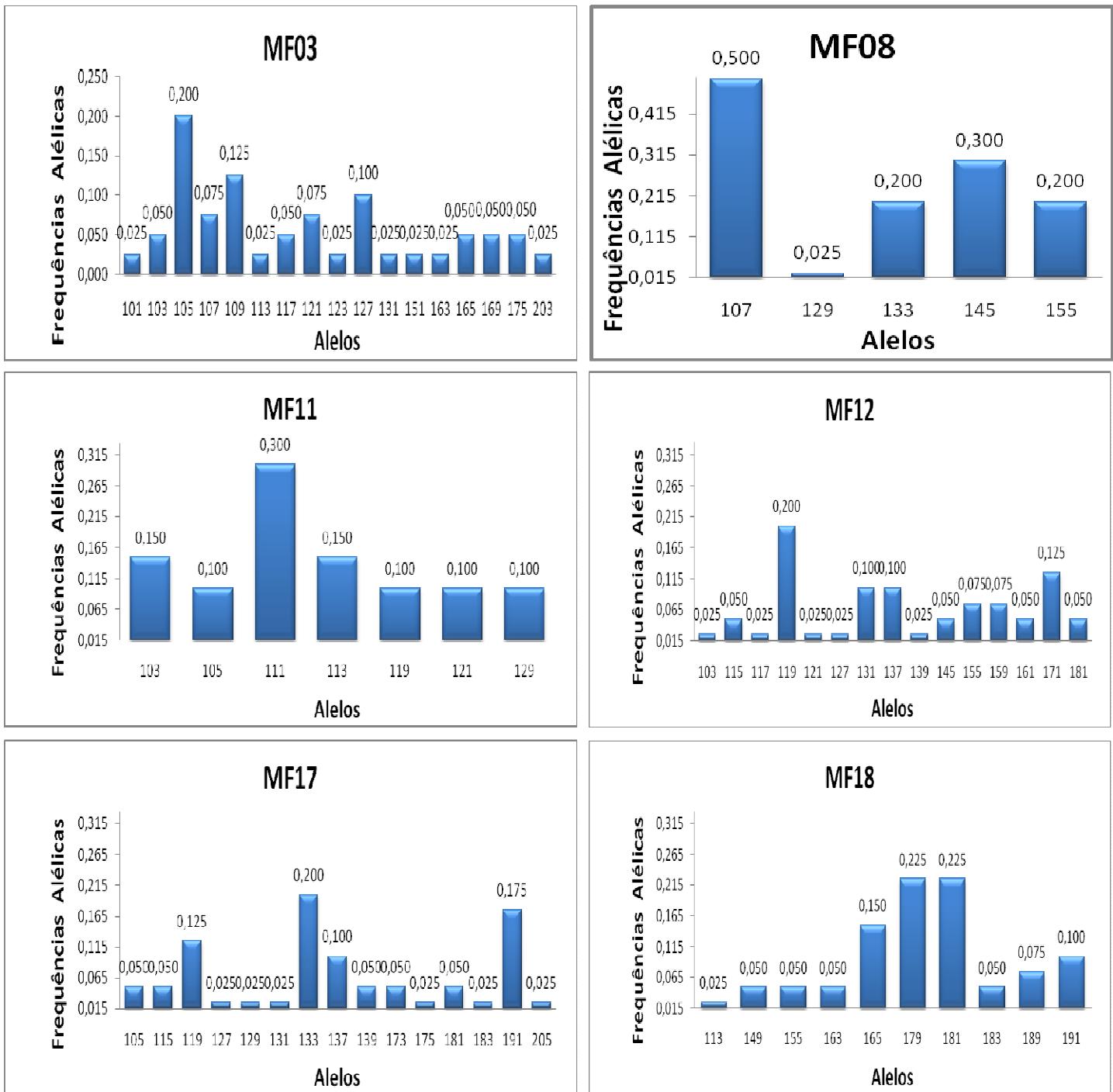


Figura 27 - Histograma das frequências alélicas dos seis locos microssatélites, estimados para 20 indivíduos da população 2 de *Mauritia flexuosa*. O eixo Y indica a frequência alélica e o eixo X indica o número do alelo, em pares de base. As respectivas frequências se encontram acima de cada coluna.

Considerando que os locos estudados não estão em equidade gênica (baixa amplitude de variação), pois apresentam frequências alélicas entre 0,020 e 0,300, esse resultado difere dos observados por Silva (2006) que observou de 60 a 80% de equidade para as duas populações estudadas de *Geonoma schottiana* Mart. Segundo Frankel *et al.* (1995), a maior equidade nas frequências alélicas de uma população é um indicador de maior diversidade genética e de menor susceptibilidade aos efeitos da deriva genética se comparada às que têm alelos muito

menos frequentes do que outros. Dessa forma, espécies que apresentam maior variação das frequências alélicas ou menor equidade gênica possuem risco de gerar fixação e perda de alelos quando submetidas a perturbações e gargalos genéticos. Na avaliação feita em *M. flexuosa* pode-se comprovar que as frequências não possuem equidade, portanto a espécie está mais suscetível a efeitos de endogamia e perturbações o que poderia acarretar problemas futuros com a conservação da mesma.

6.4.3. Estimativa dos índices de diversidade genética

Entre estes parâmetros, A e H_e são muito influenciados pela deriva genética, em razão de os alelos raros (com frequência inferior a 0,05) não serem retidos em pequenas amostras. Porém, para inferir se a diversidade genética em uma população será mantida em longo prazo, apenas a quantificação número médio de alelos (A) é insuficiente. Para esse tipo de inferência, é necessária a análise comparativa de A e H_e , especialmente porque o valor de H_e é influenciado tanto pelo número de alelos como pela distribuição de suas frequências relativas (Raposo *et al.*, 2007).

Os valores de heterozigosidade observada (H_o) variaram na população 1 de 0,00 (MF11) a 0,458 (MF8), tendo uma média de 0,277 para os seis locos estudados. Já na análise da heterozigosidade esperada, (H_e) variou de 0,858 (MF8) a 0,922 (MF11) tendo como média 0,833 (Tabela 11).

Os valores encontrado na população 2 em relação a heterozigosidade observada (H_o) variaram de 0,000 (MF11) a 0,700 (MF18) com uma média de 0,408. A heterozigosidade esperada (H_e) variou de 0,784 (MF8) a 0,923 (MF12) gerando uma média de 0,877 (Tabela 12). Gaiotto *et al.* (2003) encontraram valores similares de diversidade gênica ($\hat{H}_e = 0,749$) e heterozigosidade observada ($\hat{H}_o = 0,700$) em *Euterpe edulis*. Em razão da heterozigosidade média observada ter sido inferior a heterozigosidade esperada para as duas populações, ficou caracterizado o predomínio de homozigotos. O aumento de homozigotos indica a possível existência de um processo endogâmico, decorrente de desvios de panmixia e/ou deriva genética.

Tabela 11 – Estimativa de diversidade gênica dos seis locos SSR de *M. flexuosa* pela análise de 24 indivíduos (população 1).

Locos	Tamanho da Amostra	H_o	H_e	<i>na</i>	<i>ne</i>
MF3	48	0,375	0,885	12,000	7,529
MF8	48	0,458	0,859	13,000	6,295
MF11	48	0,000	0,890	10,000	7,783
MF12	48	0,291	0,922	14,000	10,285
MF17	48	0,125	0,880	11,000	7,245
MF18	48	0,416	0,865	11,000	6,545
Média		0,277	0,883	11,833	7,614
Desvio Padrão		0,180	0,022	1,472	1,427

Dados: Heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), número de alelos observados (*na*) e número de alelos efetivos (*ne*).

Tabela 12 – Estimativas de diversidade gênica dos seis locos SSR de *M. flexuosa* pela análise de 20 indivíduos (população 2)

Locos	Tamanho da Amostra	H_o	H_e	<i>na</i>	<i>ne</i>
MF3	40	0,550	0,929	17,000	10,666
MF8	40	0,100	0,784	5,000	4,255
MF11	40	0,000	0,846	7,000	5,714
MF12	40	0,700	0,923	15,000	10,000
MF17	40	0,350	0,910	15,000	8,888
MF18	40	0,750	0,871	10,000	6,666
Média		0,408	0,877	11,500	7,698
Desvio Padrão		0,312	0,055	4,888	2,544

Dados: Heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), número de alelos observados (*na*) e número de alelos efetivos (*ne*).

Todos os locos validados detectados em *M. flexuosa* apresentaram polimorfismo (*P*) de 100%. O número médio de alelos por loco (*A*) foi de 11,5 para as populações, valor este próximo aos encontrados para outras espécies de palmeiras ($\bar{A} = 14,4$ em *Euterpe edulis*, Conte, 2004; $\bar{A} = 13,1$ em *Bactris gasipaes*, Pereira, *et al.*, 2009).

Na população 1 estes valores diferem significativamente, relatando indício de homozigose nos indivíduos a ela pertencente e teoricamente causada pelo extrativismo intenso praticado pela população local.

Observou-se elevada variação entre locos nos parâmetros de diversidade genética. As maiores estimativas de índices de fixação (*f*) foram observadas na população 1 nos locos MF11 (1,0000) e MF17 (0,8550), e a menor no loco MF8 (0,4551), já na população 2 os maiores índices de fixação foram observados nos locos MF8 (0,8693), MF11 (1,0000) e MF17 (0,6056) e os menores valores nos locos MF12 (0,2222) e MF18 (0,1176). Estes valores podem ser considerados como indícios de que as populações encontram-se em um

processo de endogamia e com possível comprometimento de sua estrutura populacional. No entanto, torna-se necessário estudos com um maior número de indivíduos e populações para se confirmar estas estimativas. Embora haja a necessidade deste tipo de estudo, fica claro que, a população da Vila apresenta valores de estimativas de índice de fixação maiores que a população do Pindaibal. Este resultado vem ao encontro do esperado, pois, a população da Vila é explorada pela população, além de apresentar uma população com um menor número de indivíduos. Este indício de processo de endogamia fica mais evidente ainda para a população da Vila, pois, mesmo tendo sido avaliado um maior número de indivíduos em sua população (25), ela apresentou maiores estimativas de índice de fixação (Tabelas 13 e 14).

Os níveis de endogamia detectados pelo índice de fixação (f) foram ligeiramente superiores na população explorada (Vila) em relação a população não explorada (Pindaibal). Uma consequência é a redução do número de indivíduos reprodutivos em populações naturais exploradas e o aumento dos cruzamentos biparentais, levando ao aparecimento de endogamia nas gerações futuras (Bawa & Krugman, 1990; Murawski, 1995 e Aldrich *et al.*, 1998).

O número de alelos observados (na) e alelos efetivos (ne) não diferiu drasticamente entre as populações. Na população 1 os valores foram, respectivamente, 11,833 e 7,614, enquanto que na população 2 foram estimados os valores de 11,500 e 7,698.

Na análise de alelos por loco, muitos alelos da população 1 não foram encontrados na população 2, totalizando 39 alelos restritos (55,7% dos alelos). Da mesma forma, uma quantidade muito próxima de alelos pertencentes a população 2 não foram encontrados na população 1, num total de 38 alelos restritos (55,1% dos alelos), levando a uma diferença de 8,6%. Este resultado mostra que há um número expressivo de alelos que caracterizam especificamente as duas populações (Vila e Pindaibal).

Tabela 13 – Estimativa do índice de fixação alélica na população 1 (Vila)

Alelo\Locos	MF3	MF8	MF11	MF12	MF17	MF18
Alelo A	-0,0213	1,0000	-0,0435	-0,0213		
Alelo B	-0,0213		1,0000			
Alelo C	-0,0213	1,0000	-0,0435		1,0000	
Alelo D	1,0000	1,0000		-0,0213		
Alelo E	0,3162	0,6444		1,0000	1,0000	-0,0435
Alelo F	0,4545	1,0000		-0,0213		0,4947
Alelo G	-0,0435	-0,0909		1,0000		
Alelo H		0,4375		0,7767		
Alelo I		0,6444		1,0000		1,0000
Alelo J		-0,0435	1,0000	1,0000		0,4103
Alelo K		0,6444	1,0000	-0,0667		0,3162
Alelo L	1,0000	-0,0435		-0,0435	-0,0435	
Alelo M	1,0000	-0,0435	1,0000	0,7000		
Alelo N			1,0000			-0,0213
Alelo O			1,0000		1,0000	-0,0213
Alelo P			1,0000			-0,0435
Alelo Q	-0,0435		1,0000		1,0000	1,0000
Alelo R	1,0000		1,0000			1,0000
Alelo S	-0,0667				1,0000	
Alelo T	1,0000			1,0000	0,7767	
Alelo U	1,0000				0,4545	
Alelo V	0,5556				1,0000	
Alelo X					1,0000	
Alelo Z					1,0000	
TOTAL	0,5676	0,4551	1,0000	0,6769	0,8550	0,5082

Tabela 14 – Estimativa do índice de fixação alélica na população 2 (Pindaíbal).

Alelo\Locos	MF3	MF8	MF11	MF12	MF17	MF18
Alelo A	-0,0256	-0,0526		-0,0256		-0,0256
Alelo B	1,0000		1,0000	-0,0526	1,0000	
Alelo C	0,6875		1,0000	-0,0256	1,0000	
Alelo D	0,3143		1,0000	0,6875	0,7714	-0,0526
Alelo E	0,6396		1,0000	-0,0256		
Alelo F	-0,0256	1,0000	1,0000		-0,0256	1,0000
Alelo G	1,0000		1,0000	-0,0256	-0,0256	
Alelo H	0,6875	1,0000			-0,0256	1,0000
Alelo I	0,3143		1,0000	-0,1111	0,4444	-0,1765
Alelo J	0,6396				1,0000	
Alelo K	-0,0256	1,0000		-0,1111	1,0000	
Alelo L	-0,0526			-0,0256		-0,0036
Alelo M	-0,0811	0,6875		-0,0526	-0,0526	0,2832
Alelo N	-0,0256			-0,0811	-0,0256	-0,0526
Alelo O	1,0000				-0,0526	-0,0811
Alelo P	-0,0256			0,6396	-0,0256	-0,1111
Alelo Q				-0,0526		
Alelo R				0,7714		
Alelo S	-0,0256			-0,0526	0,8268	
Alelo T						
Alelo U						
Alelo V						
Alelo X					-0,0256	
Alelo Z						
TOTAL	0,3931	0,8693	1,0000	0,2222	0,6056	0,1176

6.5. Transferibilidade dos marcadores SSRs de *M. flexuosa*

A transferibilidade de microssatélites entre espécies relacionadas é uma consequência da homologia da sequência de DNA presente nas regiões que flanqueiam os microssatélites (Grattapaglia *et al.*, 1998). No caso específico da transferibilidade realizada neste trabalho, as duas espécies, *M. flexuosa* e *O. oleifera*, embora sejam de gêneros e espécies diferentes, elas são da mesma família (Arecaceae), indicando a presença de sequências comuns no DNA dos indivíduos desta família.

Após a otimização e validação dos iniciadores SSRs, os seis *primers* polimórficos em buriti foram utilizados para teste de transferibilidade para o coco babaçu (*Orbignya oleifera*). Foram avaliados 15 indivíduos. Após a realização dos testes, os resultados mostraram que os iniciadores validados para o buriti foram eficientes na transferibilidade para esta espécie gerando boa amplificação e polimorfismos evidentes. Portanto 100% dos iniciadores apresentaram homologia com as sequências do *O. oleifera*, mostrando que essas duas espécies têm características genéticas próximas, podendo ser estudadas mais profundamente utilizando os *primers* SSRs desenvolvidos para *M. flexuosa*.

Os resultados encontrados neste estudo mostram que, a transferibilidade de marcadores SSRs pode acontecer entre espécies de gêneros diferentes, necessitando apenas da ocorrência de homologia na sequência de DNA presente nas regiões flanqueadoras dos microssatélites, podendo ocorrer até o nível de família.

Billotte *et al.* (2004) na construção de uma biblioteca enriquecida para *Bactris gasipaes*, desenvolveram marcadores microssatélites, e ao avaliar a conservação de polimorfismo em experiências de transferibilidade verificaram em 10 acessos de *Bactris setulosa* e em 25 acessos de *Astrocaryum macrocalyx* e *A. urostachys* a transferibilidade potencial e utilidade de marcadores microssatélites de *Bactris gasipaes* para outros gêneros da tribo Cocoeae.

Estudos envolvendo árvores tropicais têm evidenciado uma alta razão de transferibilidade de locos de microssatélites entre espécies arbóreas taxonomicamente relacionadas, como ocorre dentro das Leguminosae (Dayanadan *et al.*, 1997), Meliaceae (Write & Powell, 1997) e entre espécies de Eucalyptus (Brondani *et al.*, 1998). A absoluta transferibilidade (100% de 10 locos) foi verificada em microssatélites desenvolvidos com *Caryocar brasiliense* para cinco outras espécies do mesmo gênero (*C. coriaceum*, *C. edule*, *C. glabrum*, *C. pallidum* e *C. villosum*) indicando um alto nível de homologia do genoma e permitindo, dessa forma, estudos comparativos da estrutura genética em todas estas espécies (Collevatti *et al.*, 1999).

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e considerando as hipóteses levantadas e os objetivos propostos, as principais conclusões deste trabalho foram:

- A biblioteca foi eficiente na identificação de locos microssatélites;
- O procedimento foi eficaz no desenvolvimento de iniciadores específicos para a espécie, com uma porcentagem de 20% de iniciadores amplificando locos polimórficos e baixo índice de redundância;
- Os resultados provam que esses *primers* podem ser úteis para futuras análises genéticas;
- As populações de *M. flexuosa*, nas duas áreas estudadas, apresentaram uma pequena variabilidade genética molecular, detectada pelos marcadores microssatélites desenvolvidos;
- A população 1 (Vila) tem menor diversidade, portanto se encontra em declínio e em processo de endogamia em relação a 2 (Pindaíbal), o que pode ser efeito do processo de extrativismo local de produtos não madeireiros;
- O teste de transferibilidade permite concluir que espécies da mesma família podem ter homologia nas sequências, disponibilizando ferramentas úteis para o estudo de populações sem recursos moleculares.

Contudo, os resultados obtidos neste estudo indicaram questões adicionais a serem estudadas:

- Em função do nível de variabilidade dos locos microssatélites observado em *M. flexuosa*, recomenda-se aumentar o tamanho das amostras (>100) visando otimizar a informação genética proporcionada por esses marcadores;
- Novos estudos são necessários sobre os efeitos do extrativismo, uma vez que os resultados obtidos neste estudo podem ter sido influenciados por esta prática de exploração ocorrida no passado e pelas populações existentes;
- Finalmente, em virtude dos resultados obtidos, recomenda-se o monitoramento das gerações futuras, principalmente em áreas críticas de exploração da espécie (população 1), tendo em vista as tendências observadas no presente estudo.

8. BIBLIOGRAFIA

- Aldrich, P.; Hamrick, J.L. Reproductive dominance of pasture trees in a fragmented tropical mosaic. *Science*, v.281, p.103-105, 1998.
- Akkaya, M. S.; Bhagwat, A. A; Cregan, P. B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*, v.132, p.1131-1139, 1992.
- Aldrich, P.R.; Hamrick, J.L. Reproductive dominance of pastures trees in a fragmented tropical forest mosaic. *Science*, Washington, v. 281, p. 103-105, 1998.
- Almeida,S. P. de.; Silva, J. A. da. Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos cerrados. Planaltina: Embrapa-CPAC, 38 p. 1994.
- Altschul S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403-410, 1990.
- Applied Biosystems. ABI Prims® 3700M Genetic Analyzer, Sequencing Chemistry Guide, © Copyright 53p, 2001.
- Ashkenazi, V.; Chani, E.; Lavi, U.; Levy, D. Hillel, J.; Veilleux, E. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. *Genome*, Ottawa, v.44, p.50-62, 2001.
- Ashley MV, Willson MF, Pergams ORW *et al.* Evolutionarily enlightened management. *Biological Conservation*, 111, 115–123. 2003.
- Avise, J.C. *Phylogeography*. Harvard University Press, Cambridge. 2000.
- Avise, J. C. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*.: Sinauer Associates, 684 p. 2004.
- Bachmann, K. Molecular markers in plant ecology *New Phytologist*, v. 126, n. 3, p. 403-418, 1993.
- Balick, M. J. (ed.). *Tree of life: biology, utilization and conservation: proceedings of a symposium at the New York: Annual Meeting for Economic Botany held at the New York Botanical Garden*. P.20-35. 1986.
- Barreto, P.; Souza Júnior., C.; Anderson, A.; Salomão, R.; Wiles, J. Pressão humana no bioma Amazônia. In: IMAZON. [Home page]. Belém, PA, 2005. (O Estado da Amazônia, n. 3). Disponível em: <<http://www.amazon.org.br/especiais/> especiais.asp?id=331> 2005. Acessado em: 10/jun/2009.
- Barrett, S. C. H.; Kohn, J. R. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: FALK, D. A.; Holsinger, K. E. (Ed.). *Genetics and conservation of rare plants*. New York: Oxford University Press, p. 3-30, 1991.
- Bawa, K.S.; Krugman, S.L. Reproductive biology and genetics of tropical trees in relation to conservation and management. In: Gomes-Pompa, A.; Whitmore, T.C.; Hadley, M. (Ed.) *Rain forest regeneration and management*. Paris:Unesco, p.119-136, 1990.

Berg, E.E.; Hamrick, J.L. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. Canadian Journal of Forest Research, v.27, p.415- 424, 1997.

Balmford AR, Green E, Jenkins M. Measuring the changing state of nature. Trends in Ecology & Evolution, 18, 326–330, 2003.

Billotte, N.; Couverur, T.; Maeseilac, 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, v.4, p.580-582, 2004.

Buso, G,S,C.; Cyampi A. Y.; Moretzsohn M.C.; Souza Z.P. Protocolo para o desenvolvimento demarcadores microsatélites. Circular Técnica 20, Embrapa, Cenargen Brasília, 11p, 2003.

Braga, Renato. Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará. 2a. Edição. Imprensa Oficial, Fortaleza, Ceará, Brasil, 540p, 1960.

Brandão, M.; Carvalho, P. G. S.; Jesué, G. Guia ilustrado de plantas do cerrado de Minas Gerais. Belo Horizonte: CEMIG, 55p, 1992.

Brasmazon Catálogo. Belém, 1998. Disponível em <<http://www.brasmazon.com.br/nossosprodutos/catalog.zip>>. Acessado em: 27/maio/2009.

Braun, A. Cultivated palms of Venezuela. Principes 12(2,3): 39-103, 1968.

Braun, A. & Chitty, F. D. Palmas autoctones de Venezuela y de los paises adjacentes. Jardim Botanico de Caracas, 156p, 1987.

Brondani, R.P.V.; Brondani, C.; Tarchini, R.; Grattapaglia, D. Development, characterization and mapping of microsatellites markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. Theoretical and Applied Genetics, v.96, p.816-827, 1998.

Bryan, G.J.; Collins, A.J.; Stephenson, P.; Orry, A.; Smith, J.B.; Gale, M.D. Isolation and characterization of microsatellite from hexaploid bread wheat. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, v.94, p.557-563, 1997.

Buckley, D.P.; O'malley, D.M.; Apsit, V.; Prance, G.T.; Bawa, K.S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. e Bonpl. Lecythidaceae): 1- genetic variation in natural populations. Theoretical and applied genetics, v.76, p.923-928, 1988.

Butcher, P.A.; Moran, G.F. Genetic linkage mapping in *Acacia mangium*. 2. Development of an integrated map from two outbred pedigrees using RFLP and microsatellite loci. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, v.101, p.594-605, 2000.

Calbo, M. E. R.; Moraes, J. A. V. D. Photosynthesis, stomatal, conductance, transpiration and osmotic adjustment of buriti plants subjected to water stress. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v.9, n.2, p. 117-123, 1997.

Cascante, A.; Quesada, M.; Lobo, S.A.; Fuchs, E.J. Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Conservation Biology*, Arlington, v. 16, p. 137–147p, 2002.

Castro, J.P.C. As veredas e proteção jurídica. Fundação João Pinheiro, Belo Horizonte, v.10, n.5 e 6, p.321-333.1980.

Castro, A. Buriti (*Mauritia flexuosa*). J. W. Clay, P. T. B. Sampaio, and C. R. Clement, eds., *Biodiversidade Amazônica: Exemplos e Estratégias de Utilização*. INPA, Manaus, Brazil, p. 56–69 2000.

Cardoso, G. L., G. M. Araújo, e S. A. Silva.. Estrutura e Dinâmica de uma População de *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) em Vereda na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, MG. *Boletim do Herbário Ezequias Paulo Heringer* 9:34–48, 2002.

Cavalcante, P. B. Frutas Comestíveis da Amazônia. 5ª. Edição. Edições CEJUP/Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará, 279p, 1991.

Cerrado pode sumir até 2030. Belo Horizonte: Conservação Internacional - Brasil, 2004. Disponível em: <<http://www.conservation.org.br/noticias/noticia.php?id=31>>. Acessado em: 10/abril/2009.

Crane, P.R.; Friis, E.M.; Pedersen, K.J. The original and early diversification of angiosperms. *Nature*, 374:27-33, 1995.

Charlesworth, D.; Charlesworth, B. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Ecology and Systematics*, Palo Alto, v. 18, p. 237-268, 1987.

Chase, M.; Kessely, R.; Bawa, K. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. *American Journal of Botany*, v.83, n.1, p.51-57, 1996.

Chassy, B.M.; Mercenier, A.; Flickinger, J. Transformation of bacteria by electroporation. *Tibtech*, 6:303-309, 1988.

Chaves. R. A., Marcadores moleculares. 2002. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/trab2002/GMOL/GMOL008.htm>> Acessado em 09/Out/2009.

Coelho, A.S.G. Considerações gerais sobre a análise de QTL's. In: Pinheiro, J.B.; Carneiro, I.F. (Eds.). *Análise de QTL no melhoramento de plantas*. Goiânia: FUNAPE, p.1-36, 2000.

Coelho, A. S. G. & F. D. Valva. O processo evolutivo e o melhoramento de plantas. In L. L. Nass, A. C. C. Valois, I. S. Melo & M. C. Valadares-Inglis (Eds.) *Recursos Genéticos e Melhoramento - Plantas*. Fundação MT, Rondonópolis. p. 57-78, 2001.

Collevatti, R.G.; Brondani. R.V.; Grattapaglia, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. *Heredity*, v.83, p. 748-756, 1999.

Collevatti, R.G.; Grattapaglia, D.; Hay, J.D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. *Heredity*, v.86, n.1, p.60-67, 2001.

- Condit, R. & Hubbell, S. P. Abundance and DNA frequency of 2-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome*, v.34, p.66-71, 1991.
- Conte, R. Estrutura Genética de Populações de *Euterpe edulis*, Mart. submetidos à ação antrópica utilizando marcadores alozínicos e microssatélites (tese) ESALQ – USP. 135p, 2004.
- Creste, S.; Tulmann Neto, A.; Figueira, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.19, p.299-306, 2001.
- Dantas, A. C. M; Nodari, R. O. Marcadores Genéticos. 2006. Disponível em: <<http://www.lfdgv.ufsc.br/MARCADORESMOLECULARES2.pdf>> Acessado em 10/outubro/2009.
- Dayanandan, S.; Dole, J.; Bawa, K.; Kesseli, R. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianenses* (Meliaceae). *Molecular Ecology*, v.8, p.1585-1592, 1999.
- Dayanandan, S.; Bawa, K. S.; Kesseli, R. *et al.* Conservation of microsatellites among tropical tree (Leguminosae). *American Journal of Botany*, v.84, n.12, p.1658-1663, 1997.
- De Paula Fernandes, N. M. Estratégias de produção de sementes e estabelecimento de plântulas de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) no Vale do Acre, Brasil. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 203p, 2001.
- Devez, G. Les plantes utiles et les bois industriels de la Guyane. Société de 'Editions Géographiques, Maritimes et Coloniales, Paris, 1932.
- Doyle, J. J. & J. L. Doyle. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15. 1990.
- Dower, W.J.; Miller, J.F.; Ragsdale, C.W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Rec*, 16:6127-6145, 1988.
- Dugand, A. Palms of Colômbia. *Principes* 5(4):135-144. 1961.
- Echt, C.S.; May-Marquardt, P. Survey of microsatellite DNA in pine. *Genome*, Ottawa, v.40, p.9-17, 1997.
- Ellegren, H.; Primmer, C.R.; Sheldon, B.C. Microsatellite 'evolution': directionality or bias? *Nature Genetics*, New York, v.11, p.360-362, 1995.
- Ellstrand, N.C. Gene flow of pollen: implication for plant conservation genetics. *Oikos*, Lund, v. 63, p. 77-86, 1992.
- Ellstrand, N.C.; Elan, D.R. Population genetic consequences of small population sizes: implication for plant conservation. *Annual Review of Ecological Systematics*, Palo Alto, v. 24, p. 217-242, 1993.

Endress, B. A., D. L. Gorchov, and M. B. Peterson. Harvest of the Palm *Chamaedorea radicalis*, Its Effects on Leaf Production, and Implications for Sustainable Management. *Conservation Biology* 183:822–830, D. L. Gorchov, and E. J. Berry. 2006. Sustainability of a Non-Timber Forest Product: Effects of Alternative Leaf Harvest Practices over Six Years on Yield and Demography of the Palm *Chamaedorea radicalis*. *Forest Ecology and Management* 2341–3:181–191, 2004.

Falconer, D. S. & Mackay, T. F. C. *Introduction to quantitative genetics*. New York: Longmam Scientific & Technicals, 438p, 1989.

Falk, D.A. Integrated strategies for conserving plant genetic diversity. *Ann. Missouri Bot. Gard.* v. 77, p. 38-47, 1990.

Fao, Roma, Itália. Simple technologies for charcoal making. Rome, 154p. (FAO Forestry Paper, 41), 1983.

Fearnside, P. M., Ferraz, J. A. Conservation gap analysis of Brazil's amazonian vegetation. *Conservation Biol.*, v.5, n.9, p. 1134-1147, 1995.

Ferreira, I. M. O afogar das Veredas: uma análise comparativa espacial e temporal sobre as Veredas do Chapadão de Catalão (GO). Tese (Doutorado em Geografia) – Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro. 242p, 2003.

Ferreira, E. J; Bandeira, J. R; Melo, F. A. R; Lima, J. E. S; Santos, A. J. B; Oliveira, E. C; Braga, M. I. S; Albuquerque, S. R; Uso do buriti (*Mauritia flexuosa* L. f. Arecaceae) para a produção de biodiesel – Relatório Parcial. 2005. Disponível em: <http://www.ufac.br/homepage/noticias_2007/062_projeto_buriti/relat_buriti_eletronorte_funtac.pdf> Acessado em: 26/março/2008.

Ferreira, E. L. *Manual das palmeiras do Acre, Brasil*. Rio Branco: Instituto Nacional Pesquisas/ Universidade Federal do Acre, 212p, 2006.

Ferreira, M. E. & Grattapaglia, D. *Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análises Genéticas*. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1996.

Ferreira, M. E. & Grattapaglia, D. *Introducción al Uso de Marcadores moleculares en el Análisis Genético*. Brasilia: EMBRAPA-CENARGEN, 220p, 1998.

Frankel, O. H.; Brown, A. H. D.; Burdon, J. J. *The conservation of plant biodiversity*. Cambridge: Cambridge University Press, 299p, 1995.

Fuchs, E.J.; Lobo, J.A.; Quesada, M. Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. *Conservation Biology*, Arlington, v. 17, p. 149-157, 2003.

Fonseca, V. S.; Silva, I. M. *Etnobotânica: bases para a conservação*. Workshop Brasileiro de Etnobotânica e Botânica Econômica, 136p. 1998.

Frankham, R. *et al.* *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press 2002.

Fuchs, E. A.; Lobo, J. A.; Quesada, M. Effects of Forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. *Conservation Biology*, v. 17, p. 149-157, 2003.

Futuyma, D. J. *Biología Evolutiva*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 631p, 1992.

Gaiotto, F.A.; Grattapaglia, D.; Vencovsky, R. Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). *Journal of Heredity*, v.94, n.5, p.399-406, 2003.

Galeano, G. Las palmas de la region de Araracuara. 2a. Edición. *Estudios en la Amazonia Colombiana I. Tropembos-Colômbia*, Bogotá, Colômbia, 180p, 1991.

Galizoni, F.M. Águas da vida: população rural, cultura e água em Minas gerais. Tese (Doutorado em Ciências Sociais)-Universidade de Campinas, Campinas, SP. 189p, 2005.

Ganal, M.W.; Bonierbale, M.W.; Roeder, M.S.; Park, W.D.; Tanksley, SD. Genetic and physical mapping of the patatin genes in potato and tomato. *Mol Gen Genet*, 225:501-509. 1991.

Goldstein, D. B. & Schlotterer, C. *Microsatellites: Evolution and application*. Oxford: Oxford University Press, 352p, 1999.

Goldstein, D. & Schlotterer, C. *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford: Oxford University Press, 2001.

Grisi, M. C. de M. Mapeamento genético de locos microsatélites em feijoeiro comum na população BAT93 x Jalo EEP558. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 111p, 2006.

Grodzicker, T. *et al.* Physical mapping of temperature-sensitive mutation of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, v. 39, p. 439-446, 1974.

Grattapaglia, D. Marcadores moleculares em espécies florestais: *Eucalyptus* como modelo. In: Nass, L. L.; Valois, A. C. C.; Melo, I.S.; Valadares-Inglis, M.C (Ed.) *Recursos Genéticos e Melhoramento: Plantas*. Rondonópolis: Fundação MT, p967-994, 2001.

Grattapaglia, D; Ciampi, A. Y; Souza, K. C. D. Transferibilidade de marcadores microsatélites entre espécies da família leguminosae. *Talento Estudantil da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia: Resumo dos trabalhos*. Brasília, 108p, 1998.

Griffiths, A. J. F, Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., Gelbart, W. M. *An Introduction to Genetic Analysis*. Seventh edit. New York: W H Freeman e Co, 2000.

Hall, P.; Walker, S; Bawa, K.S. Effect of forest fragmentation on genetic diversity and mating system in tropical tree, *Pithecelobium elegans*. *Conservation Biology*, Arlington, v. 10, n. 3, p. 757-768, 1996.

Hall, T. BioEdit version 5.0.9 .North Carolina State University, Departamentt of microbiology ,1999.

- Hamilton, M.B.; Fleischer, R.C. Cloned microsatellite repeats differ between 4-base restriction endonucleases. *Journal of Heredity*, London, v.90, p.561-563, 1999.
- Hamrick, J. L. Isozymes and analysis of genetic structure in plants populations. In: Soltis, D. E.; Soltis, P. S. (ed.). London: Chapman and Hall, p.335-348, 1989.
- Hamrick, J. L.; Godt, M. J. W.; Sherman-Broyles, S.L. Factor influencing levels os genetic diversity in wood plant especies. *New Forest*, v.6, p.95-124, 1992.
- Harris, L. D. The fragmented forest: island biogeography theory and the preservation of biotic diversity. Chicago: The University of Chicago Press, 211p, 1984.
- He, G.; Meng, R.; Newman, M.; Gao, G.; Pittman, R.N.; Prakash, C.S. Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *BMC Plant Biology*, London, v.3, p.1-6, 2003.
- Helentjaris, T.; Slocum, M.; Wright, S.; Schaefer, A.; Nienhuis, J. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 72, p.761-769. 1986.
- Henderson, A.; Beck, H. T. & Scariot, A. Flora de Palmeiras da Ilha de Marajó, Pará, Brasil. *Bol. do Mus. Paraense Emílio Goeldi, Botânica* 7(2): p. 199-221. 1991.
- Henderson, A. The Palms of the Amazon. Cambridge University Press, New York, 1995.
- Heywood, V.H.; Mace, G.M.; May, R.M.; Stuart, S.N. Uncertainties in extinction rates. *Nature*, London, v. 368, p. 105, 1994.
- Holsinger, K. E. Demography and extinction in small populations. In: Young, A. G.; Clarke, G. M. Genetics, demography and variability of fragmented populations. Cambridge: Cambridge University Press, p. 55-74, 2003.
- Hoyos F., Jesus & Braun, A. *Palmas tropicales Cultivadas en Venezuela*. Soc. Y Fund. La Salle de Ciências Naturales, Monografia No. 33. Caracas, Venezuela, 132p, 1984.
- IBAMA, Ato Declaratório Ambiental. Rio de Janeiro: IBAMA, 11p, 1988.
- Implementação da CDB no Brasil: O Brasil e a Convenção sobre Diversidade Biológica. In: COP 8 / MOP 8 Web site: portal. [Brasília, DF]: Ministério das Relações Exteriores: Ministério do Meio Ambiente, 2006. Disponível em: <http://www.cdb.gov.br/impl_CDB>. Acessado em: 01/maio/2009.
- Jones, E.S.; Dupal, M.P.; Kölliker, R.; Drayton, M.C.; Forster, J.W. Development and characterisations of simple sequence repeat (SSR) markers for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.102, p.405-415, 2001.
- Kageyama, P.Y., Sebbenn, A.M., Ribas, L.A., Gandara, F.B. Castellen, M., Perecim, M.B. & Vencovsky, R. Diversidade genética em espécies tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. *Scientia Forestalis* 64:93-107, 2003.
- Kahn, F. Clave para diferenciar los géneros de palmae em la Amazonia a partir del aparato vegetativo. *Bull. Inst. Fr. Etudes Andines*, 19(2): 351-378, 1990.

Kathriarachchi, H. S., K. U. Tennakoon, C. V. S. Gunatilleke, I. A. U. N. Gunatilleke, and P. M. S. Ashton. Ecology of Two Selected Liana Species of Utility Value in a Lowland Rain Forest of Sri Lanka: Implications for Management. *Conservation and Society* 22:273–288, 2004.

Kijas, J. M.H.; Fowler, J. C. S.; Thomas, M. R. An evatuation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within Citrus and related species. *Genoma*, v.38, p.349-355, 1995.

Lander, E.S.; Weinberg, R.A. Genomics: journey to the century of biology. *Science*, Washington, v.287, n.5459, p.1777-1782, 2000.

Lande R; Thompson R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124:743-756. 1990.

Lewontin, R.C. The apportionment of human diversity. *Evol Biol*, New York, v. 6, p. 381-392, 1972.

Lowe, A. *et al.* Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application: Blackwell Publishing, 326 p, 2004.

Lowe, A. J.; Boshier, D.; Ward, M.; Bacles, C. F. E.; Navarro, C. Genetic resources impacts of habitat loss and degradation: reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity*, v. 95, p. 255-273, 2005.

Marques, D. K. S.; Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Corumbá, Mato Grosso do Sul, 2002.

Matiolo, S. R. & Passos-Bueno, M. R. S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: Matioli, S. R. (ed). Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Holos, p. 153-161, 2001.

McCauley, D.E. Effects of population dynamics on genetics in mosaic landscapes. In: Hansson, L.; Fangh, L.; Merriam, G. (eds.). Mosaic landscapes and ecological processes. London: Chapman & Hall, p. 178-198, 1995.

McNeely, J. A.; Miller, K. R.; Reid, W.; Mittermeier, R. A.; Werner, T. B. Conserving the world's biological diversity – Gland, Switzerland, Washington: IUCN/WRI/CI/WWF-US/World Bank, 193 p, 1990.

Melo, V.J.R. Determinação de paternidade em pomares de sementes de *Eucaluptus* com marcadores microssatélites. Goiânia, Dissertação (M.S) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás. 183p, 2000.

Miranda, I. P. A; Rabelo, A; Bueno, C. R; Barbosa, E. M; Ribeiro, M. N. S. Frutos de Palmeiras da Amazônia. Ministério da Ciência e Tecnologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus, Amazonas. 120p, 2001.

Morgante, M. & Olivier, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. Plant Journal, v. 3, n. 1, p. 175-182, 1993.

Moses, T. Palms of Brazil. Principes 6(1):26-37. 1962.

Murali, K. S., U. Shankar, R. U. Shaanker, K. N. Ganeshiah, and K. S. Bawa. Extraction of Non-Timber Forest Products in the Forests of Biligiri Rangan Hills, India.2. Impact of NTFP Extraction on Regeneration, Population Structure, and Species Composition. Economic Botany 50:252-269, 1996.

Murawski, D.A. Reproductive biology and genetics of tropical trees from canopy perspective. In: Lowman, M.D.; Nadkarni, N.M. (Ed.) Forest canopies. New York: Academic Press, p.457-493, 1995.

Mullis, K., Faloona, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase-catalysed chain reaction. Methods in Enzymology. New York, v.115, p. 335-350, 1987.

Nason, J.D.; Hamrick, J.L. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two cases studies of neotropical canopy trees. Journal of Heredity, Oxford, v. 88, p. 264 – 276, 1997.

Nei, M. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York. 512p. 1987.

Nei, M.; Kumar, S. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, 2000.

Nodari RO; Tsai SM; Gilbertson R; Gepts P. Towards an integrated linkage map of common bean. II. Development of an RFLP-based genetic linkage map. Theoretical Applied Genetics 85:513-520. 1992.

Nucci, S. M. Desenvolvimento, caracterização e análise da utilidade de marcadores microsatélites em genética de população de macaúba. (Dissertação de Mestrado). PG-IAC. 90p, 2007.

Nybom, H.; Ramser, J.; Kaemmer, D.; Kahl, G.; Weising, K. Oligonucleotide DNA fingerprinting detects a multiallelic locos in box elder (*Acer negundo*). Mol. Ecol. 1:65 67. 1992.

O'hanlon, P. C. *et al.* A review of new PCR-based genetic markers and their utility to weed ecology Weed Research, v. 40, n. 3, p. 239-254, 2000.

Onern L. Mapa ecológico del Perú. Guía explicativa. 147 p, 1976.

Padoch, C. J. Chota I. Jong, W. Unruh, J. Amazon agroforestry: A market-oriented system in Peru. Agroforestry Systems 3: 47-58. 1985

Padoch, C. Aguaje (*Mauritia flexuosa* L. f.) in the Economy of Iquitos, Peru. Adv. Econ. Bot. 6:214-224. 1988.

Paetkau, D.; Calveret, W.; Stirling, I.; Strobeck, C. Microsatellite analysis population in canidian polar bears. Molecular Ecology, v.4, p.347-354, 1995.

Paniego, N.; Echaide, M.; Muñoz, M.; Fernández, L.; Torales, S.; Faccio, P.; Fuxan, I.; Carrera, M.; Zandomeni, R.; Suárez, E.Y.; Hopp, H.E. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genome*, Ottawa, v.45, p.34-43, 2002.

Parker, P.G.; Snow, A.A.; Schug, M.D.; Booton, G.C.; Fuerst, P.A. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, v.79, n.2, p.361-382, 1998.

Pereira, A. A; Clement, C. R; Picanço-Rodrigues, D. Divergência genética em pupunheiras (*Bactris gasipaes* Kunth) inermes importantes para o agronegócio do palmito. 55º Congresso Brasileiro de Genética. 2009. Disponível em: <<http://web2.sbg.org.br/congress/sbg2008/pdfs2009/GP226-28618.pdf>> Acessado em: 04/setembro/2009.

Pesce, (ver no INPA-ACRE) versão em Português. 1941.

Peters, S.M.; Balick, M.J.; Kahn, F. & Anderson, A.B. Oligarchic Forests of Economic Plants in Ammonia: Utilization and Conservation of an Important Tropical Resource. *Conservation Biology*, v. 3, 4^a Ed. p.341, 1989.

Pinto, S. I. C.; Souza, A. M.; Carvalho, D. Genetic variability by isozymes in populations of *Copaifera lansdorffii* desf. In two fragments of ripain forest. *Scientia Forestalis*, n. 65, p. 40-48, 2004.

Pittier, H. Suplemento a las plantas usuales de Venezuela. Editora Elite, Caracas, 129p, 1926.

Ponce Calderón, M. E. Patrones de Caída de Frutos en *Mauritia flexuosa* L. f. y Fauna Involucrada en los Procesos de Remoción de Semillas. *Acta Botánica Venezolana* 252:167-183, 2002.

Ponce, M. E., J. Brandin, M. A. Ponce, and V. Gonzales. Germinacion y Establecimiento de Plantulas de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) en los Llanos Sur-Orientales del Estado Guarico, Venezuela. *Acta Botánica Venezolana* 221:167-183, 1999.

Pott, V.J.; Pott, A. Buriti - *Mauritia flexuosa*. Fauna e Flora do Cerrado, Campo Grande, outubro 2004. Disponível em: <<http://www.cnpgc.embrapa.br/~rodiney/series/buriti/buriti.htm>> Acessado em: 01/abril/2008.

Powell, W.; Machray, G.C.; Provan, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, Oxford, v.1, p.209-245, 1996.

Primmer, C.R.; Raudsepp, T.; Chowdhary, B.P.; Moller, A.R.; Ellegren, H. Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Research*, New York, v.7, p.471-482, 1997.

Rafalski, D.J.A. et al. Generating and using DNA markers in plant. In: Birren, B.; LAI, E. Non-mammalian genomic analysis: a practical guide. New York: Academic, p.75-134, 1996.

Ramirez, N.; Brito, Y. Reproductive of a tropical palm swamp community in the Venezuelanllanos. *American Journal of Botany* v.77, p.1260 - 1271, 1990.

Raposo, A., Martins, K., Ciampi, A. Y., Wadt, L. H. O., Veasey, E. A., Diversidade genética de populações de andiroba no Baixo Acre. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.42, n.9, p.1291-1298, 2007.

Rassman, K., Schlotterer, C. and Tautz, D. Isolation of simple sequence loci for use in PCR-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis* 12: 113-118, 1991.

Ratnam; Boyle, T. Effect of logging and other forms of harvesting on genetic diversity in humid tropical forests. In: Young, A; Boshier, D.; Boyle, T. (Ed.). *Forest Conservation Genetics: principles and practice*. Austrália: CSIRO/CABI. 352p. 2000.

Ratsirarson, J., J. A. Silander, and A. F. Richard. Conservation and Management of a Threatened Madagascar Palm Species, *Neodypsis decaryi*, Jumelle. *Conservation Biology* 101:40-52, 1996.

Reis, M.S. Dinâmica da movimentação dos alelos: subsídios para conservação e manejo de populações naturais de plantas. *Brazilian Journal of Genetics* 19:37-47, 1996.

Reitz, R. P. Flora ilustrada catarinense – I Parte. Itajaí: Instituto Florestal. Herbário ‘Barbosa Rodrigues’, 189p. 1974.

Ribeiro, J.F. & Walter, B.M.T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. Cerrado Ambiente e Flora (ed. by S. M. Sano & S. P. Almeida), Embrapa, Planaltina, Brazil. p. 89-166, 1998.

Ribeiro, J. E. L. do S.; Hopkins, M. J. G.; Vicentini, A.; Sothers, C. A.; Costa, M. A. da S.; Brito, J. M.; Souza, M. A. D.; Martins, L. H. P.; Lohmann, L. G.; Assunção, P. A. C. L.; Pereira, E. da C.; Silva, C. F.; Mesquita, M. R.; Procópio, L. C. Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. Manaus, INPA. 816p. 1999.

Ritschel, P.S.; Lins, T.C.L.; Tristan, R.L.; Buso, G.S.C.; Buso, J.A.; Ferreira, M.E. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biology*, London, v.4, p.1-14, 2004.

Rizzini, C. T. & Mors, W. B. Botânica econômica brasileira. 2^a ed. Rio de Janeiro, Âmbito Cultural, p.191, 1995.

Romano, E. & Brasileiro, A. C. M. Extração de DNA de plantas. 2005. Disponível em: <<http://www.uefs.br/disciplinas/bot859/extra.pdf>> Acessado em: 01/maio/2009.

Sanger, F. Croonian lecture, 1975 – nucleotide-sequences in DNA. *Proceedings of the Royal Society of London Series B- Biological Sciences*, Great Britain, v. 191, p. 317-333, 1975.

Saha, S.; Karaca, M.; Jenkins, J. N.; Zipf, A. E.; Reddy, O. U.; Kantenty, R. V. Simple sequence repeats as useful resources to study transcribed genes of cotton. *Euphytica*, v.130, p.355-364, 2003.

Santos, S.C.; Ruggiero, C.; Silva, C.L.S.P.; Lemos, E.G.M. A microsatellite library for *Carica papaya* L. cv. Sunrise Solo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.25, p.263-267, 2003.

Sebbenn, A. M.; Seoane, C. E. S.; Kageyama, P. Y.; Lacerda, C. M. B. Estrutura genética em populações de *Tabebuia cassinoides*: implicações para o manejo florestal e a conservação genética. Revista do Instituto Florestal, v. 13, n. 2, p. 93-113, 2001.

Schultes, R. E. Promissing structural fiber palms of the Colombian Amazon. Principles 21 (2):72-82. 1977.

Scribner, K. T. et al. Comparative Analysis of Intra- and Interpopulation Genetic Diversity in *Bufo bufo*, Using Allozyme, Single-locos Microsatellite, Minisatellite, and Multilocs Minisatellite data. Molecular Biology and Evolution, v. 11, n. 5, p. 737- 748, 1994.

Seoane, C.E.S.; Sebbenn, A.M.; Kageyama, P.Y. Efeitos da fragmentação florestal em populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. Scientia Forestalis, Piracicaba, n. 57, p. 123-139, 2000.

Seoane, C. E. C.; Sebbenn, A. M.; Kageyama, P. Y. Sistema de reprodução em populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. Revista do Instituto Florestal, v.13 (1), p.19-26, 2001.

Silva, J. C.; Barrichelo, L. E. G.; Brito, J. O.; Endocarpos de babaçu e de macaúba comparados a madeira de *Eucalyptus grandis* para a produção de carvão vegetal. IPEF, n.34, p.31-34, dez.1986. Disponível em: <<http://www.ipef.br/publicacoes/scientia/nr34/cap04.pdf>> Acessado em: 08/junho/2008.

Silva, M. S. Diversidade e estrutura genética em populações naturais de *Geonoma schottiana* Mart. no Parque Florestal Quedas do Rio Bonito (Monografia). Lavras : UFLA. 51 p, 2006.

Silvia, M. V. M, A Dinâmica Excludente do Sistema Elétrico Paraense. Tese (Doutorado em Energia) Instituto de Eletrotécnica e Energia, Universidade de São Paulo. Pg 135. 2005.

Shimizu, J. Y., Estratégia complementar para conservação de espécies florestais nativas: resgate e conservação de ecótipos ameaçados. Pesq. Flor. bras., Colombo, n.54, p.07-35, 2007

Slatkin, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. Genetics 139:457-462, 1995.

Sonstebo, J. H.; Borgstrom, R.; Heun, M. Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) from the Hardangervidda mountain plateau (Norway) analyzed by microsatellite DNA: a basis for conservation guidelines. Conservation Genetics, Dordrecht, v. 8, n. 1, p. 33-44, 2007.

Soulé, M. E. & Wilcox, B. A. Conservation Biology: Its Scope and Its Challange. In Soulé, M. E. & Wilcox, B. A. (Ed.). Conservation Biology: A evolutionary ecological perspective. Sunderland: Sinauer Associates, p. 151-170, 1980.

Southern, E. M. Detection of specific sequence DNA among fragments separated by electrophoresis. Journal of Molecular Biology, New York, v. 98, p. 503-517, 1975.

Souza, S.A.C.D. Avaliação da variabilidade genética em *Musa spp*. Utilizando marcadores microsatélites. Piracicaba. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 86p, 2002.

Souza, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L.L.; Valois, A.C.C.; Melo, I.S.; Valadares-Inglis, M.C. (Ed.) Recursos Genéticos e Melhoramento: plantas. Rondonópolis: Fundação MT, p. 939-966, 2001.

Srikwan, S.; Woodruff, D. S. Genetic erosion in isolated smallmammal populations following rainforest fragmentation. In: Young, A. G.; Clarke, G. M. Genetics, demography and variability of fragmented populations. Cambridge: Cambridge University Press, p. 149-172, 2003.

Staden, R. The Staden sequence analysis package. Mol Biotechnol, v.5, n.3, Jun, p.233-241. 1996.

Storti, E. F. Biologia floral de *Mauritia flexuosa* Lin. Fil., na região de Manaus, AM., Brasil. Acta Amazônica, v. 23, n.4, p.371-381, 1993.

Suganuma, E. & Ciampi, A. Y. Análise genética populacional de jatobá (*Hymenaea* ssp Leguminosae) utilizando microssatélites. 2001. Disponível em: <http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/03/03pdf/03-007.pdf> Acessado em: 10/junho/2009.

Tarazi, R. Araucária: da erosão genética a corredores de fluxo gênico. 2007. Disponível em: <<http://www.genetica.esalq.usp.br/pub/seminar/RTarazi-200702-Resumo.pdf>> Acessado em 09/setembro/2009.

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

Telles, M. P. C. Diversidade genética e estrutura populacional de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) do sudeste de Goiás. Tese (doutorado), Universidade Federal de Goiás, Goiânia GO, 129p, 2000.

Uhl, N. M.; Dransfield, J. Genera Palmarum, a new classification of palms and its implications. Advances in Economic Botany, n.6, p.1-19, 1998.

Uma Shaanker, R., K. N. Ganeshiah, M. Nageswara Rao, and N. A. Aravind. Ecological Consequences of Forest Use: From Genes to Ecosystem. A Case Study in the Iiligiri Rangaswamy Temple Wildlife Sanctuary, South India. Conservation and Society 22:347-363, 2002.

Unep. Convention on biological diversity. Rio de Janeiro: United Nations Environment Programme (UNEP), 24 p. (Na. 92-7807), 1992.

Valente, R. M.; Almeida, S. S. As palmeiras de Caxiuanã: informações botânicas e utilizações por populações ribeirinhas. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, Universidade Federal do Pará, Pará. 54p, 2001.

Varshney, R.K.; Kumar, A.; Balyan, H.S.; Roy, J.K.; Prasad, M.; Gupta, P.K. Characterization of microsatellite and development of chromosome specific STMS markers in bread wheat. Plant Molecular Biology Reporter, New York, v.18, p.5-16, 2000.

Vilela-Morales, E. A.; Valois, A. C. C. Recursos Genéticos Vegetais Autóctones e seus Usos no Desenvolvimento Sustentável. Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília, v.17, n.2, p.11-42, 2000.

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

Wang, Z.; Weber, J.L.; Zhong, G.; Tanksley, S.D. Survey of plant short tandem DNA repeats. Theoretical and Applied Genetics, v.88, p.1-6, 1994.

Weber, J. L. Informativeness of human (dC-dA)n (dG-dT)n polymorphisms. Genomics, San Diego, V.7, p.524-530, 1990.

Weir, B. S. Genetic data analysis. Sinauer, Massachusetts. 377 p. 1990.

Weir, B.S. Genetics data analysis II: methods for discrete population genetic data. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 455p, 1996.

Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Kahl, G. DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods and Applications 2 ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, 444p, 2005.

Weissenbach, J.; Gyapay, G.; Dib, C.; Vignal, A.; Morissette, J.; Millaseau, P.; Vaysseix, G.; Lathrop, M. A second generation linkage map of the human genome. Nature, London, v.359, p.794-801, 1992.

White, G.M.; Boshier, D.H.; Powell, W. Genetic variation within fragmented populations of *Swietenia humilis* Zucc. Molecular Ecology, Oxford, v. 8, p. 1889-1909, 1999.

White, G.; Powell, W. Cross-species amplification of SSR loci in the Meliceae family. Molecular Ecology, v. 6, p. 1995-1997, 1997.

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

Woodruff, R.C., Gong, Y. Estimation of the deleterious Genomic Mutation Rate of *Drosophila melanogaster* by the Binscy Mutation Accumulation Assay. A. Dros. Res. Conf. 44 : 863B, 2003.

Write, G. & Powell, W. Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family. Molecular Ecology, v.6, p.1195-1197, 1997.

Wright, S.. Evolution in Mendelian populations. Genetics, 16, 97-159. 1931.

Wu, K.S.; Tanksley, D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. Molecular & General Genetics, v. 241, p.225-235, 1993.

Yang, G.P.; Merriam, H.G.; Warwick, S.I. The Effects of forest fragmentation on genetic variation in *Acer saccharum* Marsh. (sugar maple) populations. Heredity, v.71, p.277-289, 1993.

Yeh FC & Boyle T. Pogene, Version 1.31 Software Microsoft Windows – based freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta, Canada, 1999.

Young, A. et al. Forest conservation genetics: principles and practice. Collingwood: Csiro Publishing, 352 p, 2000.

Young, A., D. Boshier and T. Boyle (eds.), Forest Conservation Genetics: Principles and Practice. Springer Netherlands. Volume 3, N.2, 2002.

Zane, L.; Bargelloni, L.; Patarnello, T. Strategies of microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology, v.11, p. 1-6, 2002.

Zucchi, M.I. Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. Tese (doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ, Universidade de São Paulo - USP. 130p, 2002.