

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

**Sistema reprodutivo de tucumãzeiro (*Astrocaryum aculeatum* G.
Meyer)**

Santiago Linorio Ferreyra Ramos

MANAUS

2008

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

Santiago Linorio Ferreyra Ramos

**Sistema reprodutivo de tucumãzeiro (*Astrocaryum aculeatum* G.
Meyer)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Florestais e Ambientais, área de concentração em Silvicultura – melhoramento genético.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Teresa Gomes Lopes
Co-orientador: Dr. Raimundo Nonato Vieira da Cunha

MANAUS

2008

Santiago Linorio Ferreyra Ramos

Sistema reprodutivo de tucumãzeiro “*Astrocaryum aculeatum*” G. Meyer

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Florestais e Ambientais, área de concentração em Silvicultura – melhoramento genético.

Aprovado em 27 de Março de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a. Maria Teresa Gomes Lopes, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Francisco Adilson dos Santos Hara, Membro
Universidade Federal do Amazonas

Dr. Raimundo Nonato Vieira da Cunha, Membro
Embrapa Amazônia Ocidental

A Dios, a mi madre Josefita por su amor incondicional, a los sabios consejos de mi padre Jose (in memoriam), a la candida ternura de mis abuelos Santiago y Wilmer, y a mis hermanas Patricia y Leyla que estuvieron pendientes de mi persona, incentivando la realización de esta investigación como parte de mis metas.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À DEUS que é fonte de vida, inspiração, inteligência e sabedoria.

À Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Gomes Lopes, pela orientação, apoio, incentivo e, especialmente, por ter acreditado em mim para realizar este trabalho, permitindo-me melhorar o meu desenvolvimento científico e profissional e, ainda, pela boa amizade nestes anos de trabalho.

Ao pesquisador da Embrapa Amazônia Ocidental, M.Sc. Jeferson Luis Vasconcelos de Macedo, pela co-orientação, ensinamentos, incentivo, humildade no repasse de seus conhecimentos e, sobretudo, pela grande amizade que construímos durante nosso convívio.

À Prof^a. Dr^a. Doriane Picanço Rodrigues, pelo apoio, incentivo e, pela hospitalidade no laboratório de genética da Universidade Federal do Amazonas durante os trabalhos de SSR.

As pesquisadoras Kyara Formiga de Aquino e Jacqueline da Silva Batista, pela amizade, incentivo e ajuda nos trabalhos de sistema de detecção laser no Laboratório Temático de Biologia Molecular – INPA.

Aos pesquisadores da Embrapa Amazônia Ocidental, D.Sc. Ricardo Lopes e D.Sc. Raimundo Nonato Vieira da Cunha pela amizade, co-orientação em algumas etapas do trabalho e pela hospitalidade no laboratório de produção de sementes de dendê para realização das atividades de germinação do tucumã.

Ao Prof. Dr. Luis Antonio Serrão Contim, pelo treinamento e pela hospitalidade no laboratório de Biotecnologia da Universidade Nilton Lins durante os trabalhos de extração de DNA. Assim como ao estudante de doutorado em Biotecnologia e Professor da Universidade Nilton Lins Danival Vieira de Freitas pela amizade, incentivo e colaboração.

À D.Sc. Charles Roland Clement pelo apoio e incentivo nesta pesquisa.

À Universidade Federal do Amazonas e ao programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais, incluindo os professores e funcionários, pelos conhecimentos adquiridos e pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelos recursos financeiros concedidos através da bolsa de estudos.

À minha mãe “Josefita”, por seu amor e carinho infinito, pelas suas orações e seu exemplo de perseverança na busca de nossa felicidade familiar, assim como a minhas irmãs, Patrícia e Leyla, pela união, amor e carinho recebidos dos ensinamentos de nossa mãe.

A Livyn por mostrar-me um caminho que ainda não conhecia.

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

AGRADEÇO

*Nossas mentes possuem por natureza um
insaciável desejo de saber a verdade.
“Marco Tulio Ciceron”*

RESUMO

O tucumãzeiro (*Astrocaryum aculeatum* G. Meyer) é uma espécie não domesticada, cujas populações naturais espontâneas apresentam grande variabilidade nas suas características morfológicas, constituindo-se na fonte de recursos genéticos para o melhoramento da espécie. Nos últimos anos, os marcadores moleculares são empregados no estudo do sistema reprodutivo de espécies vegetais, visando apoiar os programas de melhoramento genético. O objetivo desse trabalho foi estudar o sistema reprodutivo do tucumã, empregando marcadores Microsatélites. Coletaram-se amostras de folhas maduras e os frutos maduros de 11 plantas (matrizes) de uma população espontânea de tucumãzeiros. As amostras de folhas foram utilizadas para o estudo do sistema de reprodução e os frutos, constituíram as sementes para o estudo de propagação e produção de plântulas para complementação do estudo de reprodução. O método de propagação foi feito em duas fases. Na primeira, utilizaram-se as sementes das matrizes selecionadas para o estudo de sistema reprodutivo. Na segunda fase, coletaram-se sementes de três procedências, onde se avaliaram o tempo de secagem natural, o tempo de embebição e a velocidade de germinação. Em ambos os casos, as sementes foram despulpadas e os pirênios colocados em um ambiente natural para secagem. Após o desprendimento, separaram-se as sementes dos endocarpos. Em seguida, as sementes foram imersas em água para reidratar. Após essa fase, foram colocadas em uma sala para germinar. Semanalmente efetuava-se uma triagem, retirando-se as sementes germinadas que eram levadas para um viveiro e semeadas em tubetes. Após a emergência, as plântulas que apresentavam de três a quatro folhas bífidias eram transplantadas para sacos plásticos pretos para formação de mudas. Para a determinação do sistema reprodutivo do tucumã, extraiu-se o DNA dos folíolos das plantas pelo método de extração de Brometo de Cetiltrimetilamônio. A quantificação do DNA genômico foi realizada em gel de agarose, por comparações visuais de sua fluorescência, com padrões de massa molecular de DNA. Foram amplificados oito loci de DNA dos tucumãzeiros avaliados. Para a reação de polimerase em cadeia dos loci, utilizou-se o protocolo descrito por Schuelke (2000), com algumas modificações, e a genotipagem dos loci foi visualizado em seqüenciador automático. No estudo de propagação, constatou-se que os pirênios de tucumã sob secagem natural levaram em torno de um mês para desprender as sementes do endocarpo. As sementes germinaram completamente em um prazo máximo de 50 dias, apresentando uma percentagem de germinação que variou entre 60 a 85%, depois de haverem sido reidratadas

por 15 dias. O intervalo de tempo para a secagem natural, a reidratação e a germinação completa do tucumã, situou-se entre 67 a 95 dias. Assim, são necessários em torno de 161 dias para se obter uma plântula de tucumã com a primeira folha completa. A procedência das sementes exerce grande influência na velocidade e na uniformização da germinação. No estudo do sistema reprodutivo do tucumã, observou-se que a estimativa da taxa de cruzamento uniloco e multilocos foram $t_s=0,978$ (EM) ou $0,984$ (NR) e $t_m=0,978$ (EM e NR), respectivamente, indicando que a espécie é predominantemente alógama. A Diferença negativa entre as taxas de cruzamento multiloco e uniloco, sugerem que não ocorrem cruzamentos endogâmicos na população, $t_m - t_s = -0,001$ (EM) ou $-0,007$ (NR). A correlação de paternidade detectado foi baixo, $r_p = 0,176$ (EM) ou $0,205$ (NR), demonstrando que as progênes são constituídas principalmente por meios-irmãos. O coeficiente de coancestria (θ_{xy}) nas progênes foi $-0,133$ (EM) ou $0,119$ (NR), o esperado em progênes de meios-irmãos(0,125).

Palavras-chave: Tucumã, propagação, melhoramento genético, marcadores moleculares, taxa de cruzamento.

ABSTRACT

The tucumãzeiro (*Astrocaryum aculeatum* G. Meyer) is a species not domesticated, whose spontaneous natural populations present great variability in its morphologic characteristics, consisting in the source of genetic resources for the improvement of the species. In recent years, the molecular markers are used to assist in the study of the mating system of vegetal species, aiming at the support of the genetic improvement programs. The objective of this work is to study the mating system of tucumã using marking Microsatellites. Mature leaves samples had been collected and the mature fruits of 11 plants (matrices) of a spontaneous population of tucumãzeiros. The leaves samples had been used for the study of the mating system and the fruits had constituted the seeds for the propagation study and production of seedlings for the mating study complementation. The propagation method was made in two phases. In the first one had been used the seeds of the selected matrices for the study of mating system. In the second phase, seeds of three origins had been collected in order to evaluate the natural drying time, the time of water imbibition and the speed of germination. In both cases, the seeds had been pulped and the pyrenes placed in a natural environment for drying. After the unfastening, the endocarps seeds had been broken up. After that, the seeds had been immersed in water to rehydrate. After this phase, they had been placed in a room to germinate. Weekly a selection was effected, leaving the germinated seeds that were taken for a fishery and sown in tublets. After the emergency, the plant in which the four bifid leaves were presented of three were transplanted for black plastic bags for formation of seedling. For the determination of the mating system of tucumã, the plants leaves surface DNA was collected using the method of extraction of Cetyltrimethylammonium Bromide. The quantification of the genomic DNA was carried through in agarose gel, for visual comparisons of its fluorescence, with standards of DNA molecular mass. They had been amplified eight locus of DNA of the evaluated tucumãzeiros. For the reaction of polymerase in chain of locus, the described protocol for Schuelke was used (2000), with some modifications, and the genotypic identification of loci was visualized in automatic sequence. In the propagation study, one evidenced that the tucumã pyrenes under to the process of natural drying lead around one month to unfasten the seeds of endocarp. The seeds germinated completely, in a maximum stated period of 50 days, presenting a percentage of germination that varies between 60-85%, after having been rehydrated per 15 days. The time interval for the natural drying, the rehydration and the complete germination of tucumã, is

placed between the 67-95 days. Thus, are necessary around 161 days to get tucumã seedlings with the first complete leaf. The origin of the seeds exerts great influence in the germination speed and uniformization. In the study of the mating system of tucumã, it was observed that tucumã a Direct single locus and multilocus outcrossing rate estimates were $t_s=0,978$ (EM) ou $0,984$ (NR) and $t_m=0,978$ (EM e NR), respectively, indicating that the species is predominantly allogamous. The negative difference between multilocus and single locus outcrossing rate suggesting that biparental inbreeding population has not occurred, $t_m - t_s = -0,001$ (EM) ou $-0,007$ (NR). Low value of paternity correlation was detected, $r_p = 0,176$ (EM) ou $0,205$ (NR), demonstrating that families are composed by half-sibs, mainly. The coefficient of coancestry (θ_{xy}) within families was $-0,133$ (EM) or $0,119$ (NR), the expected in half-sibs families ($0,125$).

Key-word: Tucumã, propagation, genetic breeding, molecular markers, outcrossing rate.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	Xiv
LISTA DE GRÁFICOS.....	Xv
INTRODUÇÃO.....	16
1. REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA.....	19
1.1. Generalidades sobre o tucumãzeiro “ <i>A. aculeatum</i> ”.....	19
1.1.1. Taxonomia.....	19
1.1.2. Origem e evolução.....	20
1.1.3. Ecologia da espécie.....	20
1.1.4. Características morfológicas e dispersão.....	20
1.1.5. Utilização e importância.....	23
1.1.6. Germinação.....	24
1.2. Melhoramento e domesticação.....	26
1.3. Marcadores moleculares.....	27
1.3.1. Marcadores baseados em microsatélites.....	28
1.3.2. Reação de polimerase em cadeia.....	30
1.4. Sistema reprodutivo.....	31
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1. Coleta do material.....	34
2.2. Métodos de propagação e formação de mudas de <i>A. aculeatum</i>	35
2.2.1. Propagação e formação de mudas.....	35
2.2.2. Secagem natural, embebição e germinação das sementes de tucumã.....	37

2.3. Estudo do sistema de cruzamento do tucumã.....	40
2.3.1. Extração do DNA.....	40
2.3.2. Quantificação e diluição do DNA.....	42
2.3.3. Amplificação dos loci microsátélites no DNA de tucumã.....	42
2.3.3.1. Reação de polimerase em cadeia (PCR) dos primers.....	43
2.3.3.2. Diluição e genotipagem dos lócus.....	44
2.3.4. Sistema de cruzamento do tucumã.....	44
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
3.1. Métodos de propagação e formação de mudas de <i>A. aculeatum</i>	46
3.1.1. Propagação e formação de mudas.....	46
3.1.2. Secagem natural, embebição e germinação das sementes de tucumã.....	48
3.2. Sistema de cruzamento do tucumã.....	57
4. CONCLUSÕES.....	63
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Descrição do processo germinativo das sementes de <i>A. aculeatum</i> (GENTIL e FERREIRA, 2005).....	25
--	----

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Quantidade de sementes utilizadas por matriz.....	37
Tabela 2. Distribuição dos tratamentos, por procedência, no ensaio para avaliar o tempo de germinação das sementes de tucumã.....	40
Tabela 3. Matrizes de tucumã e número de progênies avaliadas.....	40
Tabela 4. Sinopses das características dos oito <i>loci</i> de seqüências simples repetidas de pupunha transferidas para tucumã.....	43
Tabela 5. Distribuição do número de sementes germinadas, por matriz, durante o período de avaliação.....	50
Tabela 6. Freqüência da germinação das sementes de tucumã em função da procedência.....	54
Tabela 7. Resumo da análise de variância para a variável percentagem de germinação.....	57
Tabela 8. Efeito da procedência das sementes sobre a variável percentagem de germinação.....	57
Tabela 9. Estimativas de endogamia, parentesco e sistema de reprodução de uma população de <i>A. aculeatum</i>	62

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1. Percentagem de germinação e número se sementes germinadas por matriz..	51
Gráfico 2. Percentagem de emergência e número de plântulas emergidas por matriz....	51
Gráfico 3. Perda de água (%) dos pirênios de tucumã durante o processo de secagem natural, determinada pelo método de estufa a 105 ± 3 °C, por 24 horas (BRASIL, 1992) e pela pesagem semanal dos pirênios.....	52
Gráfico 4. Absorção de água (%) pelos pirênios de três procedências de tucumã, durante o processo de embebição, determinada pelo método de estufa a 105 ± 3 °C, por 24 horas (BRASIL, 1992) e pela pesagem diária dos pirênios.....	52
Gráfico 5. Número de sementes germinadas e percentagem de germinação, por tratamento, para <i>A. aculeatum</i>	55
Gráfico 6. Número de dias verificados nas etapas do processo de secagem natural, embebição e germinação de <i>A. aculeatum</i>	55

INTRODUÇÃO

As palmeiras são espécies vegetais tipicamente tropicais e que vêm suprindo as necessidades do homem durante séculos, fornecendo alimentos (frutos, palmito, sucos e óleo comestível), energia, madeira, fibras e dezenas de subprodutos do óleo. Poucos grupos de plantas despertam a atenção da humanidade quanto às palmeiras. Na literatura, são relatadas como o grupo de plantas mais úteis ao homem, mas, paradoxalmente, destaca-se como a família de importância econômica que apresenta o menor número de espécies domesticadas (LLERAS *et al.*, 1983). Uma das justificativas está na associação dessas espécies com sociedades primitivas e culturas indígenas.

Mesmo com importância econômica comprovada, as pesquisas com recursos genéticos de palmeiras sempre foram instáveis, especialmente as espécies nativas da Amazônia. No mundo tem-se registro de 3000 espécies, desse total, 390 tem ocorrência no Brasil, sendo a maioria nativa da Amazônia onde ocorrem 41 gêneros e 290 espécies (FAO, 1987). Nesta região, pelo menos cinco gêneros vem se destacando pela importância regional, nacional e até internacional, dentre eles o *Astrocaryum*, o qual totaliza algumas espécies potencialmente econômicas, como o *A. aculeatum* e o *A. vulgare* (KAHN e MILLÁN, 1992).

O tucumãzeiro (*A. aculeatum* G. Meyer) é uma palmeira nativa da América do Sul, encontrada nos Estados do Acre, Mato Grosso, Rondônia e, principalmente, no Amazonas, de onde provavelmente seja sua origem (SOUZA *et al.*, (1996). A ocorrência dessa espécie é comum em áreas desmatadas ou que sofreram alguma ação antrópica. A polpa do seu fruto é muito apreciada pela população da região Amazônica como alimento (COSTA, 2001; COSTA e VAN LEUWEN, 2002). A espécie é explorada quase exclusivamente de forma extrativista, porém as populações espontâneas apresentam grande variabilidade para

características como altura da planta, produção e qualidade dos frutos (tamanho, rendimento de polpa, sabor, conteúdo de fibra e óleo). Essas populações constituem a fonte de recursos genéticos para uso atual ou potencial no melhoramento genético da espécie.

Os recursos genéticos são estudados em várias etapas, iniciando pela coleta, introdução, multiplicação, conservação, caracterização e avaliação, regeneração e multiplicação para distribuição do germoplasma (JARAMILLO e BAENA, 2000). Porém, no estabelecimento de estratégias de uso e conservação dos recursos genéticos, é necessário conhecer sobre o sistema reprodutivo da espécie. O conhecimento da biologia floral de qualquer espécie é primordial para subsidiar as etapas de pré-melhoramento genético, de manejo e domesticação, além de explicar as relações existentes entre as plantas e o ambiente em que vivem, e por contribuir na interpretação de mecanismos relacionados à polinização.

Nos últimos anos, os marcadores genético-moleculares têm sido empregados para auxiliar no estudo do sistema reprodutivo de diversas espécies vegetais, fornecendo informações sobre o modo de reprodução, as estimativas dos parâmetros do sistema misto de cruzamento, da taxa de cruzamento e da taxa de autofecundação, parâmetros importantes para um programa de melhoramento genético. Além disso, o modo de reprodução e o sistema de cruzamento determinam como a variabilidade genética se organiza no espaço e no tempo. Essas informações permitem o monitoramento e a manutenção da variabilidade genética (LOPES, 1999).

Esforços para fornecer subsídios ao pré-melhoramento de *A. aculeatum* têm sido empreendidos, mas são poucas as informações disponíveis que possam indicar a superioridade genética das populações espontâneas para a produção e qualidade dos frutos e de seu óleo. Assim, a caracterização e a avaliação morfológica e molecular, tornam-se atividades essenciais para indicar genótipos que possuam superioridade.

O objetivo desse trabalho foi estudar o sistema reprodutivo do tucumã "*A. aculeatum*", empregando a técnica de marcador microssatélite (SSR - Sequências Simples Repetidas) como subsídios ao pré-melhoramento da espécie.

1 REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA

1.1 Generalidades sobre o tucumãzeiro “*A. aculeatum*”

1.1.1 Taxonomia

Nos estudos de botânica existem três tipos de classificação taxonômica vegetal, as classificações desenvolvidas por Cronquist (1981), Takhtajan (1996) e a nova classificação para o grupo filogenético das Angiospermas (SOUZA e LORENZI, 2005). Na classificação de Cronquist (1981), as palmeiras pertencem ao reino Plantae, na divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, sub-classe Arecidae, na ordem Arecales, família Areaceae. Dentro dessa família, Kahn e Millán (1992) classificam ao tucumã no gênero *Astrocaryum*, na espécie *Astrocaryum aculeatum* G. Meyer (1818).

A espécie apresenta alguns sinônimos, como: *A. tucuma* Mart. (1824), *A. aureum* Griseb. & H. Wendl. (1864), *A. caudenscens* Barb. Rodr. (1875), *A. princeps* Barb. Rodr. (1875), *A. jucuma* Linden (1881), *A. manaoense* Barb. Rodr. (1891), *A. macrocarpum* Huber (1906) (COSTA e VAN LEUWEN, 2002; HENDERSON e SCARIOT, 1993; KAHN e MILLÁN, 1992).

Da mesma forma, podem ser encontrados nomes comuns ou vulgares: Tucumã, Tucumã-açu (Brasil); Star-nut palm, Tucum palm, Tucuma (Inglês); Tucum (Francês); Tackoeman, Waran (Suriname); Chambira (Colômbia); Kuru (Guiana); Hericungo (Peru); Pi ci xing guo zong (Chinês) (VILLACHICA, 1996; INPI, 2006).

1.1.2 Origem e evolução

Espécie perene, o tucumãzeiro (*A. aculeatum* G. Meyer) é uma palmeira nativa da América do Sul, sendo encontrada nos Estados do Acre, Mato Grosso, Rondônia e, principalmente, no Amazonas, de onde provavelmente seja sua origem (SOUZA *et al.* (1996). Segundo Lleras *et al.* (1983) *apud* Oliveira *et al.* (2003), a Amazônia é o centro mais importante de diversidade genética do gênero *Astrocaryum*.

1.1.3 Ecologia da espécie

O tucumãzeiro é uma palmeira perene que ocorre no ecossistema de terra firme da Amazônia, normalmente, em áreas alteradas ou que sofreram alguma ação antrópica, como as áreas de capoeiras, com presença de vegetação secundária (LORENZI *et al.*, 1996; FAO, 1987).

1.1.4 Características morfológicas e dispersão

Segundo Cavalcante (1991); Kahn e Millán (1992); Henderson e Scariot (1993); Queiroz (1996), a espécie apresenta estipe solitário, ereto, medindo de 10 à 25 m de altura e 30 cm de diâmetro, sendo guarnecido de espinhos negros, finos, longos e pungentes, dispostos em anéis que se adensam em sua metade superior. O número de folhas varia de 6-15, as folhas pinadas medem 4-5 m de comprimento e apresentam espinhos por toda sua extensão, embora sejam mais frequentes na bainha. A inflorescência ereta mede até 2 m de comprimento, tendo as flores femininas mais concentradas na parte basal das ráquulas da espádice, e as masculinas, em maior número, ocupando o restante de cada ráquila. As flores estaminadas apresentam cerca 5 mm de comprimento, coloração creme-amarelada, dispostas em pares ou solitários em

depressões ao longo das raquillas; formadas por 3 sépalas triangulares e curtas; 3 pétalas brevemente unidas abaixo, com o dobro do comprimento das sépalas; 6 estames e com pistilódio trifido. As flores pistiladas apresentam 1,5 cm de comprimento, 2-4 por raquila; cálice e corola cupular; anel estaminoidal com 2 mm de altura e estilo alongado.

Na região de Manaus, o período de floração estende-se de julho a janeiro, e o da frutificação, de fevereiro a agosto, com pico em abril. Eventualmente, pode ocorrer um leve pico de frutificação, entre outubro e novembro, em plena época de floração. Cada indivíduo pode produzir de dois a sete cachos por ano (MOUSSA e KAHN, 1996).

Os frutos do tucumãzeiro são drupas subglobosas a elipsóides, medindo 3,0–6,0 cm de comprimento e 2,5-4,5 cm de largura, com peso variando de 30 a 150 g e apresentando cálice e corola persistentes; o epicarpo é liso e duro, possui colorações que variam do verde ao amarelado e mede 1,0-1,5 mm de espessura; o mesocarpo mede entre 2,0–10,0 mm de espessura, é compacto, firme, variando de fibroso a levemente fibroso, oleaginoso e com colorações variadas que pode ser amarelada, avermelhada ou alaranjada, e suas combinações; o endocarpo, de coloração negra a pardo-acizentada, é consistente, lenhoso, mede entre 2,5-5,0 cm de diâmetro e pesam entre 20-90 g; o tegumento da semente mede 2,0–5,0 mm de espessura e apresentam três poros, dispostos como vértices de um triângulo, sendo uma delas fértil; em geral, ocorre uma semente por fruto, mas pode apresentar sementes duplas. O endosperma apresenta-se na forma sólida (parte externa, homogênea, consistente e branca) e líquida (parte interna e incolor). O embrião, que está encerrado no endosperma sólido, mede aproximadamente 4,0 mm de comprimento e 2,0 mm de diâmetro, é reto, cilíndrico e apresenta duas regiões: a proximal, que corresponde ao pecíolo cotiledonar e envolve o eixo embrionário, e a distal, que equivale ao limbo cotiledonar que se transforma em haustório, durante o processo germinativo, para absorver os nutrientes do endosperma e nutrir a plântula em formação (MENDONÇA, 1996; MACEDO, comunicação pessoal).

Os estudos sobre sementes do tucumã ainda não apresentam uma caracterização ou definição consistente se são do tipo ortodoxa ou recalcitrante e, até o momento, constituem-se no único meio de propagação da espécie. O estudo mais recente sobre o processo germinativo do tucumã foi descrito por Gentil e Ferreira (2005), os quais também identificaram as estruturas das plântulas em formação. Os métodos e as técnicas para a produção de mudas são praticamente desconhecidos, o que provavelmente tem desestimulado o estabelecimento de plantios racionais da espécie. Em condições naturais a germinação da semente pode ocorrer entre o 1° ao 24° mês (COSTA e VAN LEUWEN, 2002a, 2002b). Segundo Gentil e Ferreira (2005), a germinação das sementes de tucumã é do tipo adjacente ligulada, com tempo médio de emergência do pecíolo cotiledonar de 104 dias, sendo que a completa expansão da primeira folha bífida é de 236 dias. Ainda, segundo esses mesmos autores, pode ser classificada como criptocotiledonar, devido à permanência do limbo cotiledonar dentro da semente, e hipógea pelo fato da semente manter-se sob o nível do substrato durante o processo germinativo.

O tucumã é uma espécie monóica, ou seja, os indivíduos apresentam os dois sexos na mesma planta, porém, possui separação morfológica - as flores masculinas ficam bem separadas das femininas – para evitar a autofecundação. Esta característica, aliada ao fato do tucumã apresentar provavelmente protoginia, mas com sobreposição das fases sexuais, indicam que a espécie seja predominantemente alógama (BACELAR-LIMA *et al.*, 2003, 2006). Com auxílio de estudos moleculares pode-se comprovar esta sugestão.

Bacelar-Lima *et al.* (2003, 2006) também avaliaram a biologia floral de *A. aculeatum* de plantas situadas no fragmento florestal do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, onde descreveram os seguintes aspectos: horário de abertura das flores (antese), receptividade do estigma, momento de liberação dos grãos de pólen, tempo de duração das flores e morfologia floral, bem como, a identificação e o comportamento de insetos visitantes

e prováveis polinizadores. Constataram que a abertura da espata ocorre entre 04h00min e 05h00min da manhã (horário de Manaus), que a inflorescência apresenta flores pistiladas na base da ráquila que variam em número de um a quatro, que a espécie apresenta protoginia, mas com sobreposição das fases sexuais, e que várias famílias de insetos das ordens Díptera, Himenóptera e Coleóptera visitam regularmente as inflorescências de tucumã.

O padrão de dispersão primária da espécie consiste na chuva de sementes, geralmente concentrada no raio de projeção da copa (3,5 m). A dispersão secundária é feita por cutias (*Dasyprocta* sp.) que depositam sementes nas proximidades das plantas, em distâncias inferiores a 15 m (BACELAR e PESSONI, 2000).

Raramente são encontrados plantios comerciais desta espécie. A ocorrência em fazendas, sítios e quintais estão geralmente associados à dispersão natural e à dispersão involuntária feita pelo homem e, ainda, à manutenção de plantas jovens e adultas deixadas nas áreas destinadas a cultivos ou pastagens.

1.1.5 Utilização e importância

Os frutos do tucumã são consumidos *in natura* podendo servir de matéria-prima para sorvetes, geléias, doces, cremes, além da extração de óleo do mesocarpo e da amêndoa. As características organolépticas dos frutos dessa palmeira os credenciam como matéria comestível de alto valor para indústria alimentícia. São também ricos em vitaminas, com destaque para a vitamina A, atingindo até 51.000 UI por 100g de polpa (OLIVEIRA, 2001). Da polpa dos frutos e das sementes podem ser extraídos diferentes tipos de óleos comestíveis, além de poderem ser utilizadas na suplementação alimentar humana e na fabricação de ração animal (MENDONÇA, 1996).

O estipe pode ser usado na construção de cercas vivas, currais e casas rústicas. As fibras das folhas são empregadas artesanalmente na fabricação de redes de pescar e de dormir, linhas para arco de flecha, cestos e balaios. O endocarpo é usado na confecção de brincos, anéis, pulseiras, colares e outros artefatos (SOUZA *et al.*, 1996).

1.1.6 Germinação

Elias *et al.* (2004) estudaram a influência da posição da semente de tucumã no substrato sobre a germinação dessa espécie. Após a extração (retirada do endocarpo) e embebição das sementes, estas foram semeadas em areia e serragem (v/v, 1:1), obedecendo as seguintes posições de semeadura: 0°, 45° e 90°, com o poro germinativo voltado para estes ângulos, formando um eixo imaginário perpendicular ao nível do substrato. Avaliaram a emergência das plântulas nos estádios de segunda bainha, emissão e expansão da primeira folha bífida e o tempo médio de ocorrência de cada estágio. Os resultados mostraram que as sementes postas na posição 90°, apresentaram maior valor percentual de plântulas com segunda bainha (45%) e o mais alto número de plântulas com primeira folha bífida (43%). Esses resultados não diferiram estatisticamente dos verificados na posição de 45°, que apresentou 31% e 28, respectivamente. Assim, concluíram que a posição de semeadura influencia na emergência de plântulas de *A. aculeatum* e que as inclinações do poro germinativo de 45° e 90°, proporcionaram os melhores resultados de emergência das plântulas.

Gentil e Ferreira (2005) avaliaram a germinação das sementes *A. aculeatum*, iniciando com a quebra mecânica do tegumento. Os testes de germinação consistiram em submeter uma parte das sementes a um pré-tratamento de embebição por nove dias, para posteriormente serem semeadas, e a outra parte, foi imediatamente semeada. Também fizeram uma

caracterização cronológica dos estádios morfológicos da plântula, descrevendo o processo germinativo das sementes (Figura 1). Os resultados mostraram que a germinação das sementes é do tipo adjacente ligulada, criptocotiledonar e hipógea. Verificaram que o tempo para alcançar cada estágio foi menor nas sementes embebidas, indicando o efeito benéfico da embebição sobre a velocidade do processo germinativo e que a média de emergência do pecíolo cotiledonar foi de 99 dias e a completa expansão da primeira folha bífida de 253 dias.

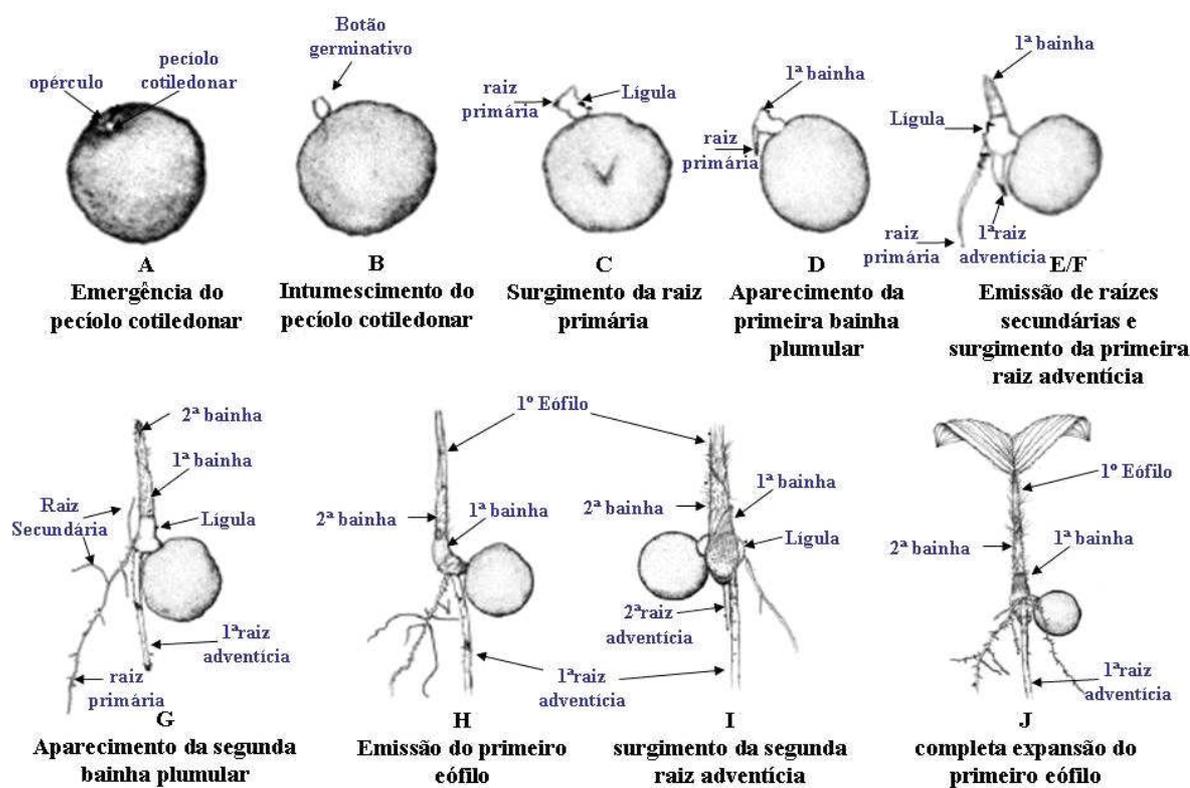


Figura 1. Descrição do processo germinativo das sementes de *A. aculeatum* (GENTIL e FERREIRA, 2005).

Ferreira e Gentil (2006) estudaram a influência da extração do tegumento e da embebição das sementes de *A. aculeatum* sobre a germinação. O experimento consistiu de seis tratamentos (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias de embebição), inteiramente casualizados, com quatro repetições. A menor percentagem de germinação (58%) ocorreu nas sementes não embebidas, e aumentou progressivamente até alcançar o valor máximo de 70% de germinação nas sementes submetidas a nove dias de embebição. O tempo médio de germinação foi de 104 dias e a distribuição da germinação durou quatro meses, sendo a primeira contagem das sementes germinadas aos 41 dias e a última aos 164 dias.

1.2 Melhoramento e domesticação

Clement (2001) ressalta que no melhoramento de espécies nativas a domesticação é uma etapa da evolução na qual o homem adiciona suas ações à ação da seleção natural. Esse mesmo autor define a domesticação de plantas como um processo co-evolucionário em que a seleção humana por meio dos fenótipos das populações de plantas promovidas, manejadas ou cultivadas, modifica os genótipos das populações, tornando as mais úteis aos humanos e melhor adaptadas às intervenções humanas no ambiente (CLEMENT, 1999).

Schroth *et al.* (2004) estudaram a produtividade e a qualidade dos frutos de plantas de uma população de tucumãzeiros, que ocupava 9 hectares de uma área cultivada de 25 hectares, nas proximidades de Manaus durante um período de 24 meses. O objetivo do estudo era identificar plantas com boas características de produção e qualidade dos frutos (tamanho, rendimento de polpa, sabor, conteúdo de fibra e óleo) e, progressivamente, melhorar essa população para essas características, utilizando um processo de domesticação *in situ*.

1.3 Marcadores moleculares

Os primeiros marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento foram os morfológicos, os quais eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral de fácil identificação visual, como o nanismo, deficiência de clorofila, cor de pétala ou morfologia foliar (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Nos últimos anos, com os avanços da genética, da biologia molecular, o advento da tecnologia de DNA recombinante, da reação em cadeia da polimerase (PCR) e do seqüenciamento automático do DNA, desenvolveu-se técnicas que utilizam marcadores genéticos que são úteis para auxiliar na identificação, caracterização e avaliação dos recursos genéticos vegetais (FALEIRO, 2007).

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

Faleiro (2007) em seu trabalho descreve as principais tecnologias disponíveis para a obtenção de marcadores genético-moleculares: a) Isoenzimas (grupo de múltiplas formas moleculares de uma enzima, resultante de variações alélicas dos genes codificadores); b) *Random Amplified Polymorphic DNA*–RAPD (fragmentos de DNA amplificados pela reação em cadeia da polimerase–PCR, utilizando *primers* curtos de 10 nucleotídeos); c) *Restriction Fragment Length Polymorphism*–RFLP (fragmentos de DNA obtidos de enzimas de restrição, separada por eletroforeses e visualizada por radioatividade); d) *Amplified Fragment Length Polymorphism*–AFLP (fragmentos de 80 a 500 pb de DNA obtidos da digestão do DNA com enzimas de restrição, seguidos da ligação de oligonucleotídeos, adaptadores e amplificação seletiva dos fragmentos via PCR); e) Minissatélites (unidades de 10 a 100 pb repetidas em

tandem, flanqueadas por sítios conservados de endonucleases de restrição); f) *Cleaved Amplified Polymorphic Sequence–CAPS* (fragmentos de DNA amplificados via PCR, utilizando-se de *primers* específicos de 20 a 30 pb, seguidos de digestão com endonucleases de restrição); g) *Single-Strand Conformation Polymorphism–SSCP* (fragmentos de DNA de 200 a 800 pb amplificados via PCR usando *primers* específicos); h) *Inter Simple Sequence Repeats–ISSR* (fragmentos de DNA de 100 a 3000 pb amplificação via PCR usando um único *primer* de 16-20 pb, construído a partir de Microsatélites); i) *PCR-Sequencing* (envolve seqüências de nucleotídeos do fragmento de DNA amplificado via PCR utilizando *primers* específicos de 15 a 30 pb, para dada região do genoma em estudo); j) Marcadores baseados em *retrotransposons* (classe mais comum de *transposons* e ocorre em grande número de cópias em genomas de plantas); l) Marcadores baseados em genômica funcional (direcionado a genes de interesse); m) *Single Nucleotide Polymorphism–SNP* (utilizado para identificar mutações e polimorfismos baseados na posição de um único nucleotídeo).

1.3.1 Marcadores baseados em microsatélites

Os genomas dos eucariotos contêm seqüências repetitivas (complexas e simples) que podem ser usadas como marcadores de DNA. As seqüências pequenas ou simples (*sequence-motif*) são mais freqüentes, arbitrariamente melhor distribuídas e formam lócus genéticos mais polimórficos que as de seqüências repetitivas complexas (minisatélites). Estas seqüências simples são denominadas pelos seguintes sinônimos: Seqüências Simples Repetidas-SSR (*Sequence Simple Repeats*), ou Sítios de Microsatélites Marcados por Seqüência - STMS (*Sequence Tagged Microsatellite Site*), Seqüências Simples Repetidas por Polimorfismo – SSRP (*Simple Sequence Repeat Polymorphism*) ou Microsatélites (BUSO *et al.*, 2003; LI, 2002; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; GUPTA e VARSHNEY, 2000; SELKOE e TOONEN 2006).

Buso *et al.* (2003); Li (2002); Selkoe e Toonen (2006) evidenciam que os SSR são um dos marcadores mais polimórficos encontrados nos genomas de animais e plantas hoje em dia, e caracterizam-se por uma seqüência de 1 a 6 nucleotídeos de comprimento que pode estar repetidas em tandem (seqüência de um fragmento de DNA que vai desde um par até cinco ou seis pares de bases, que se repetem de maneira consecutiva, originando diferentes alelos, dos quais se distinguem entre eles pela longitude total do fragmento).

Um locus de microsatélite varia normalmente em um comprimento entre 5 e 40 repetições, mas também é possível fitas mais longa das repetições. As repetições do dinucleotide, do trinucleotide e do tetranucleotide, são as escolhas mais comuns para os estudos de genética molecular. Normalmente, as repetições do dinucleotide esclarecem a maioria dos microsatélites para muitas espécies (LI *et al.*, 2002). As repetições de trinucleotide e de hexanucleotide são as classes mais comuns da repetição que aparecem em regiões de codificação porque não causam uma troca da seqüência. As repetições do mononucleotide são os de menor confiança devido aos problemas com amplificação - uns tipos mais longos da repetição são mais ou menos comuns - e poucos dados existem para examinar sua evolução (LI *et al.*, 2002).

Buso *et al.* (2003) manifesta que estas repetições provavelmente surgem na recombinação desigual ou pelo alinhamento incorreto das fitas de DNA no processo de replicação do DNA. Buso *et al.* (2003); Gupta e Varshney (2000) argumentam que as repetições de nucleotídeos mais comuns em plantas são os dinucleotídeos (CA)_n, (GA)_n e (AT)_n, enquanto que os trinucleotídeos e tetranucleotídios mais comuns são (AAT)_n, (AAC)_n, (AGC)_n, (AAG)_n, (AATT)_n e (AAAT)_n.

Os marcadores moleculares podem ser derivados de qualquer tipo de informação molecular, que forneça um polimorfismo detectável entre os organismos a serem comparados. Normalmente, estes marcadores são utilizados na análise genética e na identificação de

clones, linhagens, híbridos, cultivares, paternidade, na estimativa de diversidade, fluxo gênico, taxa de cruzamento, parentesco e na construção de mapas genéticos (SALLES *et al.*, 2003). Estes marcadores podem diferir com relação à abundância genômica, nível de polimorfismo detectado e informação genética, especificidade dos locos, reprodutibilidade. Por outro lado, a maior limitação na utilização destes marcadores é a quantidade de trabalho necessário para o desenvolvimento dos mesmos (SALLES *et al.*, 2003).

O DNA que esta dentro do perímetro de um loco de microsatélite é denominada de região flanqueada, ou seja, que estão geralmente conservadas através dos indivíduos da mesma espécie e, às vezes, de espécies diferentes (particularmente o loco do microsatélite frequentemente pode estar identificando e estar flanqueando seqüências). O amplificador do DNA é chamado de oligonucleotidos ou *primers*, este é projetado a ligar-se numa região flanqueada e dirigir a amplificação de um loco de microsatélite através do PCR. A hipervariabilidade dos microsatélites ocorre, principalmente, por pareamento errado devido ao “escorregamento” de umas das fitas simples em relação à outra por uma unidade repetitiva para frente ou para trás, mudando o numero de repetições (alelos) e o comprimento da fita de repetição, durante a replicação do DNA. À medida que a nova fita de DNA é sintetizada ela vai pareando com a que lhe deu origem. Os alelos que diferem em comprimento podem ser distinguidos por eletroforese de alta resolução do gel (GUPTA e VARSHNEY, 2000; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; SALLES *et al.*, 2003).

1.3.2 Reação de polimerase em cadeia

A reação de polimerase em cadeia (*Polymerase Chain Reaction*–PCR) para estudos genético-moleculares envolve um grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo. Baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (*primers*) que delimitam a

seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Estes *primers* são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares às seqüências específicas que flanqueiam a região alvo (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Um ciclo de PCR envolve três etapas: a desnaturação térmica do DNA molde; o anelamento de oligonucleotídeos sintéticos, que funcionam como os iniciadores da reação de polimerização, a cada uma das fitas do DNA Molde; e a extensão, que consiste na polimerização das novas fitas de DNA a partir de cada um dos iniciadores, utilizando cada um dos quatro dNTP como substrato da reação de polimerização (AZEVEDO, 2003; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

O PCR inicia-se quando a fita dupla do DNA alvo é desnaturada através da elevação da temperatura para 92 a 95 °C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35 a 60 °C, e dependendo do tamanho e seqüência do *primer* utilizado permite a hibridização DNA–DNA de cada *primer* com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos *primers*. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a seqüência alvo, de maneira que uma cópia desta seqüência é feita no processo. Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes onde, a cada seqüência, o DNA alvo é dobrado (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

1.4 Sistema reprodutivo

As espécies para continuarem a existir, acompanhando as mudanças do ambiente, devem manter certa quantidade de variabilidade genética, que deve ser preservada da ação da seleção natural. Por outro lado, Coelho e Valva (2001) ressaltam que o excesso de variabilidade genética também seria prejudicial, porque levaria a uma perda da adaptação. O

controle da quantidade de variabilidade genética é realizado através de fatores ecológicos e de mecanismos genéticos, principalmente por meio do sistema de recombinação, que é determinado pelo sistema reprodutivo. O sistema de recombinação pode ser fechado, restrito e aberto, representados, respectivamente pela agamospermia (vegetal que dá semente sem fecundação prévia), autogamia e fecundação cruzada (COELHO e VALVA, 2001). Lopes (1999) manifesta que o modelo misto de cruzamento em uma família, derivado de um único progenitor feminino, é formado por meio-irmãos e irmãos completos, em proporções ditadas pelas taxas de autofecundação ou fecundação cruzada. Todos os membros da família recebem um gameta do genitor feminino e o segundo gameta, pode vir tanto do próprio genitor feminino (autogamia ou autofecundação) ou vir de outro indivíduo (alogamia ou fecundação cruzada).

Para Coelho e Valva (2001), o sistema reprodutivo é de grande importância na regulação da estrutura gênica das populações vegetais, determinando a magnitude e a organização da variabilidade genética, exercendo uma influência importante na ação dos diferentes fatores evolutivos. Porém, Allard (1971) destaca que o sistema de acasalamento contribui para a organização genética das populações, porque os gametas são transportados de geração em geração, exercendo um controle primário sobre as distribuições das frequências genotípicas que afetam o potencial de recombinação das populações, modelando ou acelerando a taxa de produção de novas combinações gênicas e a perda de algumas já existentes.

Rodrigues (2006), explica que o sistema de reprodução determina como a informação genética é transferida de uma geração para outra, e como a variabilidade genética se organiza no espaço e no tempo. O sistema de reprodução pode ser caracterizado basicamente por dois modelos: o aleatório e o modelo misto de reprodução. O modelo de cruzamento aleatório é o modelo de equilíbrio de Hardy Weinberg - HW, que mostra como as distribuições das

freqüências gênicas são transmitidas de uma geração para outra. No modelo de reprodução mista, a taxa de cruzamento pode ser estimada por dois métodos: o primeiro é conhecido como o Equilíbrio de Endogamia de Wright – EEW, que pressupõe que toda a endogamia observada pode ser atribuída ao sistema de reprodução, ou seja, autofecundação e cruzamentos entre aparentados; o segundo método é baseado nos genótipos *multilocus*, observados em progênies de mães conhecidas, permitindo a obtenção de estimativas mais adequadas da taxa de cruzamento, sendo o mais empregado, pois considera as combinações genotípicas envolvendo todos os *loci*. As estimativas são obtidas por máxima verossimilhança, e admite que as populações se reproduzam por autofecundações a uma taxa “*s*” e por cruzamentos aleatórios a uma taxa “*t*”, permitindo a observação de cruzamentos não ao acaso (cruzamentos entre parentes e autofecundações).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do material

Para os estudos do sistema de cruzamento e do método de propagação de *A. aculeatum*, foi coletado um par de folíolos de folhas maduras e os frutos maduros de 11 plantas (matrizes), previamente selecionadas por suas características de produção e qualidade dos frutos, de uma população espontânea de tucumãzeiros, na propriedade Najatuba, localizada no lado esquerdo do Igarapé Tarumã-Açú, lote 12, do Projeto Fundiário Manaus. Após a coleta do material (folíolos e frutos), essas plantas matrizes foram identificadas no campo. Os folíolos das matrizes foram utilizados para o estudo do sistema de cruzamento e os frutos constituíram as sementes para o estudo de propagação e produção de plântulas para complementação do estudo de cruzamento.

Os folíolos de cada matriz foram colocados em sacos plásticos tipo *zip lock*, previamente identificados e contendo sílica gel, com o objetivo de retirar a umidade e evitar a decomposição dos mesmos.

As sementes foram coletadas nos meses de pico da frutificação da espécie (março e abril de 2006). Após a retirada da polpa, secagem e quebra do tegumento, as sementes das progênes foram transportadas para o Laboratório de Sementes de Dendê da Embrapa Amazônia Ocidental, localizado na Rodovia AM-10, km 29, zona rural de Manaus, para os estudos prévios de germinação, emergência e produção de mudas. Cada plântula formada na progênie foi selecionada, com base no vigor e ausência de anomalias, onde se identifico 25 plântulas das progênes de cada matriz selecionada para o estudo de cruzamentos, perfazendo um total de 270 progênes, e coletou-se uma folha bífida para complementar aquele estudo. As folhas das 11 matrizes e das 270 plântulas foram encaminhadas ao laboratório de biotecnologia da Universidade Nilton Lins para os trabalhos de extração do DNA genômico.

Para os estudos de tempo de secagem natural, embebição e velocidade de germinação das sementes de tucumã, foram coletadas sementes de três procedências.

2.2 Métodos de propagação e formação de mudas de *A. aculeatum*

A propagação foi feita em duas etapas: a primeira, com as sementes das matrizes selecionadas para o estudo de cruzamentos, que visava à produção de plântulas para coleta de amostras de folhas visando a complementação desse estudo; e a segunda etapa, com sementes coletadas de três procedências, as quais foram submetidas a duas frequências de troca de água na embebição e a diferentes choques de temperatura antes da germinação, na tentativa de se identificar uma combinação de fatores que estimulasse uma germinação uniforme. Nessa última etapa, realizaram-se ensaios de avaliação do tempo de secagem natural, do tempo de embebição e da velocidade de germinação das sementes.

2.2.1 Propagação e formação de mudas

Os frutos coletados das 11 matrizes (Tabela 1) foram despulpados e os pirênios (sementes com endocarpo) colocados em um ambiente natural para secagem à sombra. Periodicamente, verificava-se quando as sementes se desprendiam do endocarpo. Após o desprendimento e com auxílio de uma prensa de bancada (morsa), extraíram-se as sementes dos endocarpos. No processo de separação, eventualmente, algumas sementes foram danificadas. Assim, por constatação visual, eliminaram-se todas as sementes com danos físicos, utilizando-se para o estudo somente aquelas íntegras fisicamente. As sementes selecionadas foram identificadas por matrizes e colocadas em sacos plásticos transparentes, perfurados em toda sua extensão, os quais foram mergulhados em tanques com água, que era trocada diariamente no período da manhã, para iniciar a embebição (reidratação). Essa fase

durou somente quatro dias. Em seguida, as sementes foram colocadas à temperatura ambiente, para uma breve secagem, para serem submetidas a um tratamento antifúngico com uma solução de benomyl (benlate) e ditiocarbamato (dithane), na concentração de 5,0 g e 10,0 g respectivamente do produto comercial, diluídos em 1 litro de água, respectivamente. Em seguida, as sementes foram colocadas em sacos plásticos transparentes identificados, preenchidos com ar e amarrados na boca, e deixadas em uma sala para iniciar o processo de germinação.

Três a quatro vezes por semana efetuava-se uma triagem (Tabela 6), retirando-se as sementes germinadas e eliminando-se as sementes contaminadas com fungos. As sementes germinadas eram identificadas e levadas para um viveiro - coberto com sombrite 50% - onde eram semeadas em tubetes preenchidos $2/3$ de seu volume com substrato comercial “Plantmax”.

Na sementeira, as sementes foram posicionadas no substrato com o opérculo formando um ângulo de 45° em relação ao tubete. Em seguida, foram cobertas com 2 cm de substrato e irrigadas sempre que necessário. Após a emergência, as plântulas que apresentavam de três a quatro folhas bífidas foram transplantadas para sacos plásticos pretos, próprios para a produção de mudas, com capacidade para 2 kg, contendo um substrato preparado com terriço de mata e esterco de galinha curtido e peneirado, na proporção 6:1 (m/m), onde se adicionaram mais $1,5 \text{ kg m}^{-3}$ de calcário dolomítico e $1,0 \text{ kg m}^{-3}$ de superfosfato triplo.

Nessa etapa, empregou-se a estatística descritiva para analisar os parâmetros de distribuição da germinação no tempo (dias), a percentagem e o total de sementes germinadas de cada matriz em relação à quantidade de sementes totais utilizadas no estudo, e os dados de emergência comparados ao número de sementes colocadas para germinar.

Tabela 1. Quantidade de sementes utilizadas por matriz.

Matriz	Quantidade de sementes	Matriz	Quantidade de sementes
1	89	9	77
2	58	11	106
3	170	16	150
4	86	17	59
6	175	18	115
		20	190

2.2.2 Secagem natural, embebição e germinação das sementes de tucumã

Visando avaliar se a origem das sementes exercia algum efeito sobre a aceleração e uniformização da germinação, foram coletadas sementes de três procedências: a) uma mistura de sementes do mercado de Manaus (Mercado); b) sementes coletadas de plantas de populações espontâneas de Maués-AM (Maués); e c) um lote de sementes coletadas no chão, provenientes de um único cacho de uma planta da população espontânea da propriedade Najatuba (Tarumã-Açú). Os frutos coletados foram despulpados e os pirênios (sementes com endocarpo) colocados em um ambiente natural para secagem à sombra.

Antes de submeter os pirênios ao processo de secagem, determinou-se o teor de água de cada uma das procedências pelo método da estufa a 105 ± 3 °C, por 24 horas (Brasil, 1992), aplicando para cada uma de elas, três amostras com 5 sementes cada. Semanalmente, durante o período de secagem, para cada procedência, determinava-se a perda de massa úmida dos pirênios, em duas amostras contendo 25 unidades selecionadas aleatoriamente. Ao final do período de secagem, quando se constatou que em todos os pirênios as sementes se desprenderam do endocarpo, efetuou-se uma nova determinação do teor de água dos pirênios pelo método da estufa a 105 ± 3 °C, por 24 horas. Os dados permitiram estimar a perda do teor de água dos mesmos, tomando-se como base o grau de umidade inicial.

Com auxílio de um termohigrógrafo, efetuou-se o monitoramento diário das condições de temperatura e umidade do ambiente onde as sementes foram colocadas para secar naturalmente. Passados 32 dias, constatou-se que 100% das sementes haviam se desprendido do endocarpo, e que a umidade relativa do ar e a temperatura média do ambiente registraram 24,9°C e 55,2%, respectivamente. Após o desprendimento e com auxílio de uma prensa de bancada (morsa), extraíram-se as sementes dos endocarpos. Todas as sementes danificadas durante esse processo foram eliminadas.

Antes de submeterem-se as sementes ao processo de embebição para reidratação, determinou-se o teor de água pelo método da estufa a 105 ± 3 °C, por 24 horas (Brasil, 1992). Para tanto, utilizaram-se três amostras com 5 sementes cada. Esse dado serviu de base para se estimar o grau de umidade das sementes ao final do período de embebição.

Cada tratamento foi composto por uma amostra de 20 sementes fisicamente íntegras. As sementes foram identificadas conforme o local de procedência e colocadas em sacos plásticos transparentes, perfurados em toda sua extensão, os quais foram mergulhados em tanques com água limpa.

Separaram-se os tratamentos em dois grupos; em um deles substituiu-se a água uma vez ao dia e no outro a água foi substituída duas vezes ao dia. JUSTO *et al.* (2007), ressalta que a germinação da semente é um processo fisiológico que se inicia com a embebição e culmina com a protrusão da radícula, e dependente de água, oxigênio e temperatura adequada, a qual exerce efeito significativo sobre a germinação total, a velocidade e a sincronização da germinação. Assim, a troca diária da água é fundamental para evitar o apodrecimento das sementes, o aparecimento de limo e o desenvolvimento de microrganismos (KITZKE, 1958 *apud* FERREIRA e GENTIL, 2006).

O período máximo de embebição, que nesse estudo durou 14 dias, foi determinado pelo monitoramento diário do peso das sementes até atingirem um peso constante, onde não

mais absorviam água. Finalizado o período de embebição, as sementes foram submetidas a diferentes choques de temperatura, na tentativa de se identificar que combinação de fatores aceleraria e estimularia a uma germinação uniforme. Os tratamentos testados foram: i) Sementes sem tratamento de T°; ii) Sementes imersas em H₂O a 50°C por 5 minutos; iii) Sementes imersas em H₂O a 10°C por 5 minutos; iv) Sementes imersas em H₂O a 50°C, por 5 minutos e, em seguida, em H₂O a 10°C por mais 5 minutos; v) Sementes imersas em H₂O a 10°C por 5 minutos e, em seguida, em H₂O a 50°C por mais 5 minutos.

Realizada essa etapa, as sementes foram colocadas em sacos plásticos transparentes identificados, preenchidos com ar e amarrados na boca, e deixadas em uma sala para iniciar o processo de germinação. Uma vez por semana efetuava-se uma triagem retirando-se as sementes germinadas e eliminando-se as sementes contaminadas com fungos. Para não interferir nos resultados, as sementes não foram tratadas com fungicidas nessa fase.

Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, com os tratamentos distribuídos em um arranjo fatorial 3 x 2 x 5 (3 locais de procedência das sementes x 2 frequências de troca de água x 5 choques de temperatura). Essa combinação de fatores totalizou 30 tratamentos (Tabela 2). As comparações entre os fatores foram feitas utilizando-se a análise de variância (ANOVA). Para aquelas variáveis em que o teste-F foi significativo, utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para avaliar a diferença entre as médias dos tratamentos. Na germinação assinalaram-se valores de “0” e “1” para as sementes não germinadas e para as sementes germinadas, respectivamente. Para normalização, os dados foram transformados para $(X+1)^{1/2}$. Empregou-se a estatística descritiva para analisar os dados de perda e ganho de água das sementes nas etapas de secagem natural e tempo de embebição e da percentagem de germinação das sementes.

Tabela 2. Distribuição dos tratamentos, por procedência, no ensaio para avaliar o tempo de germinação das sementes de tucumã.

Tarumã-Açú		Maués		Mercado	
T1	A1b1c1	T11	a2b1c1	T21	a3b1c1
T2	A1b1c2	T12	a2b1c2	T22	a3b1c2
T3	A1b1c3	T13	a2b1c3	T23	a3b1c3
T4	A1b1c4	T14	a2b1c4	T24	a3b1c4
T5	A1b1c5	T15	a2b1c5	T25	a3b1c5
T6	A1b2c1	T16	a2b2c1	T26	a3b2c1
T7	A1b2c2	T17	a2b2c2	T27	a3b2c2
T8	A1b2c3	T18	a2b2c3	T28	a3b2c3
T9	A1b2c4	T19	a2b2c4	T29	a3b2c4
T10	A1b2c5	T20	a2b2c5	T30	a3b2c5

2.3 Estudo do sistema de cruzamento do tucumã

2.3.1 Extração do DNA

Para o processo de extração de DNA foi utilizado o método CTAB (MURRAY e THOMPSON, 1980). O DNA genômico total foi extraído das amostras de folhas coletadas das 11 matrizes selecionadas e das 270 plântulas dessas matrizes (Tabela 3), perfazendo um total de 281 amostras para o estudo de cruzamentos. Ritland (2004) argumenta que quando se utiliza os marcadores de microsátélites para estimar os cruzamentos, geralmente, deve se utilizar uma amostra de 200 indivíduos, o que implica em um erro de 3 a 5%.

Tabela 3. Matrizes de tucumã e número de progênies avaliadas.

Matrizes	Nº de progênies	Matrizes	Nº de progênies	Matrizes	Nº de progênies
1	25	6	25	17	24
2	21	9	25	18	25
3	25	11	25	20	25
4	25	16	25		

Para o processo de extração do DNA, foram retiradas 100 mg de tecido foliar de cada uma das 281 amostras (matrizes e seus filhos) e fragmentadas em pedaços bem pequenos. Cada uma das amostras foi colocada em um gral de porcelana, onde se adicionou 800 µl de tampão ou detergente de extração de Brometo de Cetiltrimetilamônio 2X (CTAB), para ser macerada com auxílio de um bastão de porcelana. O produto resultante da maceração de cada uma das amostras foi colocado em tubos de ensaio tipo *appendorf*, de 1,5 ml de capacidade, previamente identificados. Em seguida, em cada amostra, acrescentaram-se dois µl de 2-β-mercaptoetanol. Os tubos foram tampados e incubados em banho-maria a uma temperatura de 60 °C, durante 30 minutos. Entretanto, a cada 10 minutos, os tubos eram invertidos para homogeneizar a suspensão. Em seguida, foram colocados para esfriar e, logo após, adicionou-se 600 µl de Clorofórmio e Álcool Isoamílico – CIA, na proporção 24:1. Feito isso, os tubos foram centrifugados a uma velocidade de 14.000 rpm por 12 minutos.

Após a centrifugação, a solução dos tubos separou-se em duas fases, a superior ou aquosa (que contém os ácidos nucleicos) e a inferior ou orgânica (que contém proteínas, polissacarídeos ou pigmentos). Pipetou-se toda a fase aquosa de cada uma das amostras, as quais foram depositadas em outros tubos de ensaio tipo *appendorf* previamente identificados. A fase inferior da solução dos tubos foi eliminada. Aos tubos contendo a fase aquosa, adicionaram-se 400 µl de Isopropanol frio (-20 °C) e misturou-se devagar para permitir a precipitação do DNA. O material foi incubado por 12 horas (*overnight*) a -20 °C. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 7.500 rpm por 10 minutos.

Centrifugada, a solução dos tubos separou-se em duas fases, a superior e em maior quantidade que contém o isopropanol (que precipitou o DNA por ter tirado por competição as moléculas de água do DNA, a que as torna insolúveis) e a inferior que contém o *pellet* (DNA). Depois se identificou o *pellet* e realizou-se a eliminação do Isopropanol sem afetar o *pellet*, em seqüência acrescentou-se por duas vezes um ml de etanol absoluto a 70% ao *pellet* de cada

amostra por 10 minutos. Posteriormente colocou-se um ml de etanol absoluto a 100% por três minutos, retirando-se em seguida o máximo possível deste etanol e deixando-se secar na capela por meia hora. O *pellet* foi combinado com 75 µl de uma solução tampão TE (Tris-HCl e EDTA) acrescido de RNase. O TE evita a degradação do DNA e a RNase permite a degradação das enzima de RNA. Esta foi incubada por 2 horas a 37 °C e *vortexada* de 30 em 30 minutos para a digestão do RNase. O material final foi armazenado em um refrigerador.

2.3.2 Quantificação e diluição do DNA

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Genética do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. A quantificação do DNA genômico foi realizada em gel de agarose 0,8 % (p/v) por comparações visuais de sua fluorescência com padrões de massa molecular de 50, 100 e 200 ng/µl de DNA do fago lambda. Para coloração, os géis foram colocados por 15 minutos em uma solução contendo 2 gotas de brometo de etídeo (*stock*), 800 ml de água destilada e 200 ml de TBE 1X. Posteriormente, foram fotografados sob luz UV.

Quantificado o DNA *stock*, eles foram diluídos a uma concentração de 10 ng de DNA/µl com água mili-Q, onde o DNA diluído foi distribuído nas placas para serem misturados e utilizados na solução para a realização dos PCR dos locos (*primers*).

2.3.3 Amplificação dos loci microsatélites no DNA de tucumã

Foram avaliados oito pares de locos ou *primers* (Tabela 4) que foram desenvolvidos para pupunha (*Bactris gassipaes*), porem, transferidos e selecionados para a genotipagem de plantas de tucumã. Adicionou-se na extremidade 5' do *primer forward* de todos os *locus*, a seqüência M13 (5' TGTAACGACGGCCAGT 3') com um fluorocromo específico (6-

FAM, HEX) que permite a fluorescência e identificação no sistema de detecção laser (*Megabase*), segundo o protocolo descrito por Schuelke (2000) com algumas modificações.

Tabela 4. Sinopse das características dos oito *loci* de seqüências simples repetidas de pupunha transferidas para tucumã.

SSR Locus	Motivo da repetição	Seqüência do primer (5' - 3')	Ta (°C)	Comprimento do alelo (bp)	Nº Alelos
mBg41	(GA) ₁₆	F:TGGAGGTTTCAAGATAGAC R:AGTGTGGCGATCTGTC	52	155-165	8
mBg58	(GA) ₁₇	F:TTTGATACCCAGAGAGA R:AGCGAGAAACACGAATAC	52	290-318	15
mBg62	(GA) ₁₆	F:CTACAGGGAGTGCATCTAC R:CCACCATTGAGCAATATTAG	52	164-192	9
mBg66	(GA) ₁₉	F:GCATGTTGCATTGACTA R:GAATCCTGGTTCAGATACT	52	236-252	7
mBg77	(GA) ₂₁	F:TTTGCATGTTGGGACAT R:ACTGCTACTGGCACTGTAAG	58	202-214	6
MBg91	(GA) ₂₃	F:TTTGCATGTTGGGACAT R:ACTGCTACTGGCACTGTAAG	52	180-210	5
Bg17	(CT) ₃ (GT) ₁₃	F:TTGTCTGCTCTAGCTCATTGG R:CGCTCAATCCAGTGCAAG	52	225-265	15
Bg55	(GT) ₂ GC(GT) ₃ GC(GT) ₅	F:TTCTGGGTGCGGTGGTAG R:TGATGGACTGAAGAGATGGAATAG	52	315-333	11

Ta: Temperatura de anelamento.

Fonte: Adaptado de BILLOTE *et al.* (2004) e MARTÍNEZ *et al.* (2002).

2.3.3.1 Reação de polimerase em cadeia (PCR) dos primers

O processo do PCR inicia-se com a preparação e distribuição da reação padrão ou PCR mix. O PCR foi realizado em 10 µl reação, contendo volumes de 4,3 µl de H₂O mili-Q; 1,0 µl do buffer Tp10X; 1,0 µl de mix dNTP (20 µl de cada dNTP mais 720 µl H₂O mili-Q); 1,0 µl de MgCl₂ (2,5 mM/µl); 1,0 µl de *primer reverse* (2,5 mM/µl); 0,5 µl de *primer forward* (2,5 mM/µl); 0,5 µl de *primer* fluorescente M13 (5 mM/µl); 0,2 µl do LGC Biotecnologia Taq DNA polimerase (5 U/µl); e 4,0 µl de DNA (10 ng/µl).

As amplificações dos PCRs foram executadas em um termociclador *Mastercycler Gradient da Eppendorf*. As PCRs foram desenvolvidas em duas etapas, conforme descrito por

(RODRIGUES *et al.*, 2004). A primeira etapa consistiu na desnaturação a 94°C por 2 min, seguida por 25 ciclos a 94°C por 10s., a temperatura de anelamento (T_a) do *primer* (Tabela 3) por 20s e finalmente a 72°C por 30s. A segunda etapa inicia-se por um ciclo de 72°C por 15 min, 20 ciclos a 94°C por 10s, logo a 50°C por 20s, depois a 72°C por 30s, e finaliza com uma extensão a 72°C por 30 min.

2.3.3.2 Diluição e genotipagem dos lócus

Do produto obtido das PCRs, uma parte foi diluída em uma proporção de 10%, especificamente 5 μ l do PCR é diluído em 45 μ l de H₂O mili-Q para ser utilizada na genotipagem. Os produtos de PCR (diluídos) gerados foram visualizados em seqüenciador automático (*Mega Base 1000*). A estimativa do tamanho dos alelos - pares de bases (pb) - foi realizada com os programas *Fragment Profiler* (*GE Healthcare, England*), auxiliado pelo marcador de peso molecular (*Size Standard*) ET-400-ROX (*GE Healthcare, England*).

2.3.4 Sistema de cruzamento do tucumã

Utilizou-se o programa MLTR “*Multilocus Mating System Program*” desenvolvido por Ritland (2002), para a análise genética, onde se caracterizaram as taxas unilocus e multilocus de um modelo que estima as taxas de cruzamentos mistos e correlacionados, assim como as frequências gênicas dentro das populações de plantas utilizando a estrutura da família de uma população por meio de estimativas de máxima verossimilhança (RITLAND e JAIN, 1981; RITLAND, 2004). Este método baseia-se em algoritmos (equações) de probabilidades de Máximas Esperanças “EM” (encontra estimativas da frequência do gene) e probabilidades de Newton–Raphson “NR” (calcula uma contagem para cada observação que é derivada da probabilidade dessa observação, com respeito ao parâmetro de interesse). Na pesquisa foi

estimada: 1) a taxa de cruzamento *multilocus* (t_m) da população; 2) a taxa de cruzamento média *unilocus* (t_s) da população; 3) a taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados ($t_m - t_s$); 4) a correlação da taxa de cruzamento ou autofecundação entre as progênies (r_t); 5) a correlação de paternidade de cruzamento entre dois irmãos, ou a proporção de irmãos-completos entre irmãos de cruzamento dentro das progênies (r_p); e 6) a correlação de cruzamento ou autofecundação entre *locus* dentro das progênies (r_s). A taxa de cruzamento *multilocus* (t_m) de cada família foi estimada pelo método de Momentos “MME” (RITLAND, 2002). O erro padrão das estimativas foi estimado por reamostragem *bootstrap*, onde as unidades de amostragem foram às plantas dentro das progênies para a taxa de cruzamento individual por progênie e as progênies para a taxa de cruzamento populacional. Utilizaram-se 1000 reamostragens entre e dentro das progênies (RITLAND, 2004).

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

O tamanho efetivo da variância $\hat{N}_{e(v)} = 0.5 / (\hat{r}_{xy} / 2)$, foi estimado de acordo com Cockerham (1996).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Métodos de propagação e formação de mudas de *A. aculeatum*

3.1.1 Propagação e formação de mudas

A técnica empregada detectou sementes cuja germinação se desenvolveu em três estádios: primeiro, a emergência do pecíolo cotiledonar, segundo o intumescimento do pecíolo cotiledonar e, terceiro, o surgimento da raiz primária, conforme descrito por Gentil e Ferreira (2005), para a morfologia de desenvolvimento de plântula de *A. aculeatum*. Ao atingirem o terceiro estádio, as sementes eram repicadas para os tubetes para a formação das plântulas.

Nessa fase do estudo, constatou-se que a germinação das sementes foi bastante desuniforme; iniciou no terceiro dia após a embebição, e teve duração total de 269 dias (Tabela 5). Gentil e Ferreira (2005) também constataram que as sementes de *A. aculeatum* germinaram de forma desuniforme, mesmo no tratamento que apresentou o melhor resultado de germinação, que foi a imersão das sementes em água por nove dias. Provavelmente, parte dessa variação esteja relacionada à origem do lote de sementes utilizadas, que era composto de uma mistura de diferentes procedências. Neste estudo, utilizaram-se sementes provenientes de um mesmo cacho oriundo de uma mesma progênie. Contudo, isso não assegurou uma germinação uniforme das sementes (Tabela 5), indicando que a técnica empregada nessa fase do estudo não foi eficaz para acelerar e homogeneizar a germinação das sementes.

O tempo médio para atingir a germinação máxima - período transcorrido entre a embebição e a emergência do pecíolo cotiledonar - foi de 80,5 dias, utilizando o método proposto por Edmond e Drapala (1958) *apud* Silva e Nakagawa (1995). No trabalho de Gentil e Ferreira (2005), o tempo médio entre estes dois estádios foi de 99 dias. Essa diferença,

provavelmente, se deve à origem do material coletado para o estudo, ou a técnica de propagação utilizada.

Com relação à percentagem total de sementes germinadas por matriz, observa-se que a germinação variou entre 43,68% para as progênes da matriz 20 e de 86,52% para as progênes da matriz 1 (Gráfico 1). Esses dados estão próximos daqueles obtidos por Ferreira e Gentil (2006), que conseguiram 58% de germinação do tucumã no tratamento com sementes não embebidas em água, e de 70% de germinação com sementes submetidas a nove dias de embebição.

Nesse estudo, as sementes que não germinaram foram aquelas que na separação da semente do endocarpo sofreram algum dano mecânico, que não foi possível detectar visualmente, e que durante o processo de germinação estas sementes se deterioraram ou foram infectadas por fungos.

No viveiro, acompanhou-se o período de emergência das plântulas nos tubetes. Observou-se que o aparecimento do primeiro eófilo ocorreu, em média, 50 dias após a repicagem das sementes germinadas para os tubetes, e que a primeira folha bífida surgiu 30 dias após o surgimento do eófilo, totalizando 80 dias para se obter uma plântula com a primeira folha. Contando a partir do final do processo de embebição até a formação da primeira folha bífida, são necessários 161 dias, em média, para se obter uma plântula morfológicamente formada. Gentil e Ferreira (2005) observaram que a completa expansão da primeira folha bífida (Figura 1-estádio j) se deu, em média, 253 dias após a instalação do experimento.

No Gráfico 2 apresentam-se os resultados de emergência das plântulas por matriz. Acompanhando a tendência dos resultados obtidos na germinação das sementes, verifica-se que a matriz que apresentou a maior percentagem de plântulas emergidas foi a matriz 1 (60,67%) e a que apresentou a menor percentagem de emergência foi a matriz 20 (22,63%).

Vale ressaltar, que entre a germinação das sementes e a emergência das plântulas, houve uma significativa perda, em virtude de o botão germinativo, muito tenro, ter sido bastante contaminado por microorganismos e microfauna que surgiram no substrato dos tubetes.

Outra característica observada no desenvolvimento das plântulas no viveiro foi o desenvolvimento pronunciado das raízes, tanto em tamanho quanto em volume. De tal forma, que no momento do transplântio para os sacos, as raízes das plântulas já ocupavam uma proporção de aproximadamente 60-70% do volume dos tubetes, indicando que essa é uma das características da espécie que auxilia na sua capacidade de adaptação e desenvolvimento em áreas alteradas.

3.1.2 Secagem natural, embebição e germinação das sementes de tucumã

No ensaio de propagação e formação de mudas, mencionado anteriormente, constatou-se que a germinação de *A. aculeatum* foi bastante desuniforme, onde as sementes duraram um período de 269 dias para germinarem (Tabela 5). Por isso, realizou-se esta etapa no processo de propagação do tucumã, que visava identificar uma combinação de fatores que acelerassem e estimulassem a uma germinação mais uniforme das sementes.

Estes resultados demonstraram que o processo de secagem natural dos pirênios permitiu o desprendimento interno das sementes do endocarpo, em todos os tratamentos, ao final de 32 dias, expostos em um ambiente cuja umidade relativa do ar e temperatura média registraram 55,2% e 24,9°C, respectivamente. Ao final desse período, os pirênios apresentaram uma redução total no teor de água de 7,65%, passando de um teor de água inicial de 22,04% para um teor de água final de 14,39% (Gráfico 3). Para fazer uma comparação com esses resultados, que foram obtidos após secagem forçada em estufa, efetuaram-se pesagens semanais da perda de água dos pirênios no processo de secagem

natural. Foi constatado que os mesmos passaram de um teor inicial de água de 22,04% para um teor final de 14,73%, correspondendo a uma perda de 7,31% de água (Gráfico 3). Os resultados obtidos nesta etapa do estudo, assemelham-se aos identificados por Ferreira e Gentil (2006) que submeteram pirênios de *A. aculeatum* a um processo de secagem e, ao final de 30 dias, a maioria das sementes se desprenderam do endocarpo e que a redução no teor de água registrado foi de 9%, passando de um teor de água de 23% (inicial) para 14% (final).

As avaliações diárias durante o processo de embebição demonstraram que as sementes de tucumã absorveram o máximo de água - e com o ganho de massa mantendo-se constante - no período compreendido entre o 14º e 15º dia após o início do processo de embebição (Gráfico 4), indicando que esse é o tempo no qual as sementes da espécie *A. aculeatum*, após a secagem, devem ser submetidas para reidratarem e iniciarem a germinação.

No transcorrer do processo de embebição houve um aumento médio de 19,51% no teor de água das sementes, passando de um teor de água inicial de 14,39% para um teor de água médio final de 33,90% (Gráfico 4). Este aumento considerável no teor de água, provavelmente se deve às variáveis físicas de difusão e osmose que atuam nas sementes ao ficarem imersas em água por um determinado período de tempo. Ferreira e Gentil (2006), estudando o processo de germinação de tucumã, constataram que no transcorrer de 15 dias de embebição, houve o aumento de 11% no teor de água das sementes, passando de 20% (inicial) para 31% de água (final).

Tabela 5. Distribuição do número de sementes germinadas, por matriz, durante o período de avaliação.

Matrizes	Data																																	
	26/7/2006	31/7/2006	3/8/2006	7/8/2006	9/8/2006	11/8/2006	14/8/2006	16/8/2006	18/8/2006	22/8/2006	25/8/2006	28/8/2006	30/8/2006	1/9/2006	4/9/2006	6/9/2006	11/9/2006	14/9/2006	18/9/2006	25/9/2006	3/10/2006	11/10/2006	18/10/2006	26/10/2006	14/11/2006	27/11/2006	6/12/2006	14/12/2006	9/1/2007	31/1/2007	23/2/2007	16/4/2007		
	Nº sementes germinadas																																	
1			2	2	3	3	3	4	4	16	8	2	2	3	5		2	2	1					1							1	2	6	4
2			1			2	3	2		1			1	1	1	1	1						1		2		1				5	1	1	2
3		4	4	14	3	5	9	3	1	6	6	1			2	2	8	3	1	2		1		2	4					7	4	5	11	
4			3	2	1	2	2	5	3	5	2		1	1		1	1							3	2	2					6			1
6							6	4	3	6	4	2	3	3	3		4	1		4	2	2	2	2	2	5				11	3	3	4	
9	1	3	4	5	2	4	3	5	1	2		1		1	1					2	1		1	1		2				1	1	2	4	
11		3	1	3	1	1	3	2	2	3	2				3	1	6	1	1	1			6	2	1					12	2		5	
16			2		1	3	2	4	6	6	7	2	1	1	5	1	2	1		4	2	2		2	1	2				1	1	5	7	
17			4	4		5	4			4	1												1	5						3			1	
18		1	1		2	2	3	4	6	2	2	4	1	3	1	1	5	5	1	2				1	1	2				3				
20						2	2	2	4	16	7	1	1	2	4	2	6		1			1	1	1		3	1	1	1	3	4	4	13	

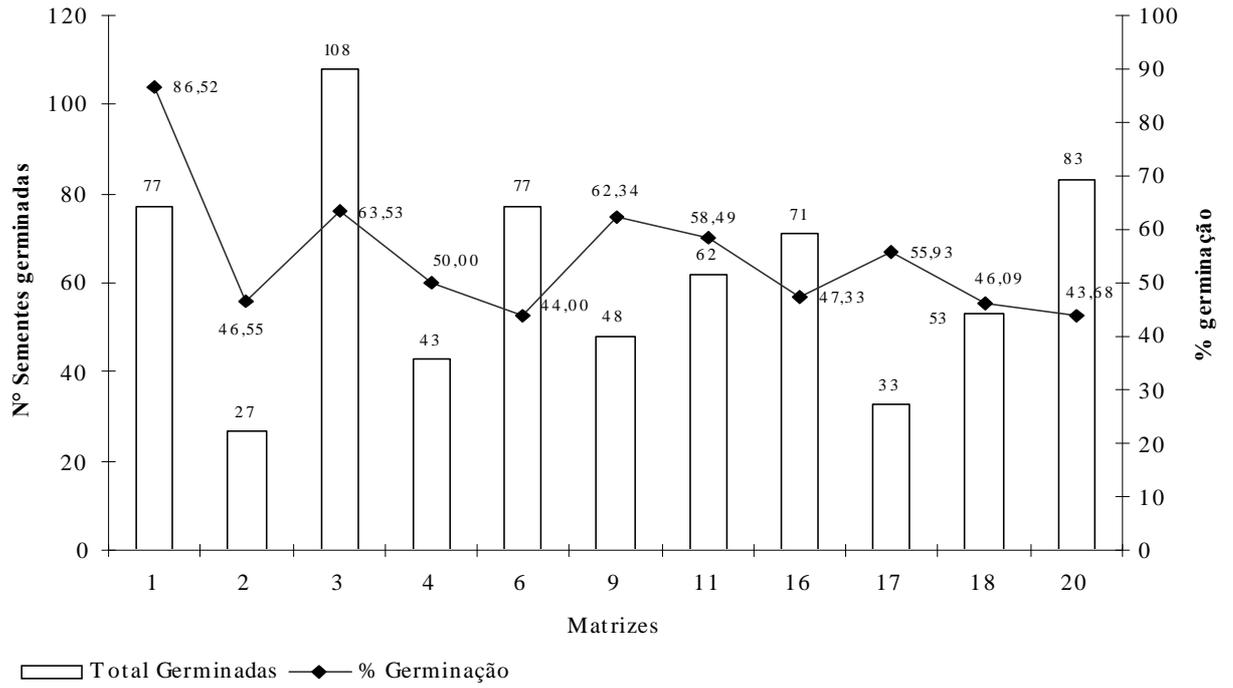


Gráfico 1. % germinação e número de sementes germinadas por matriz.

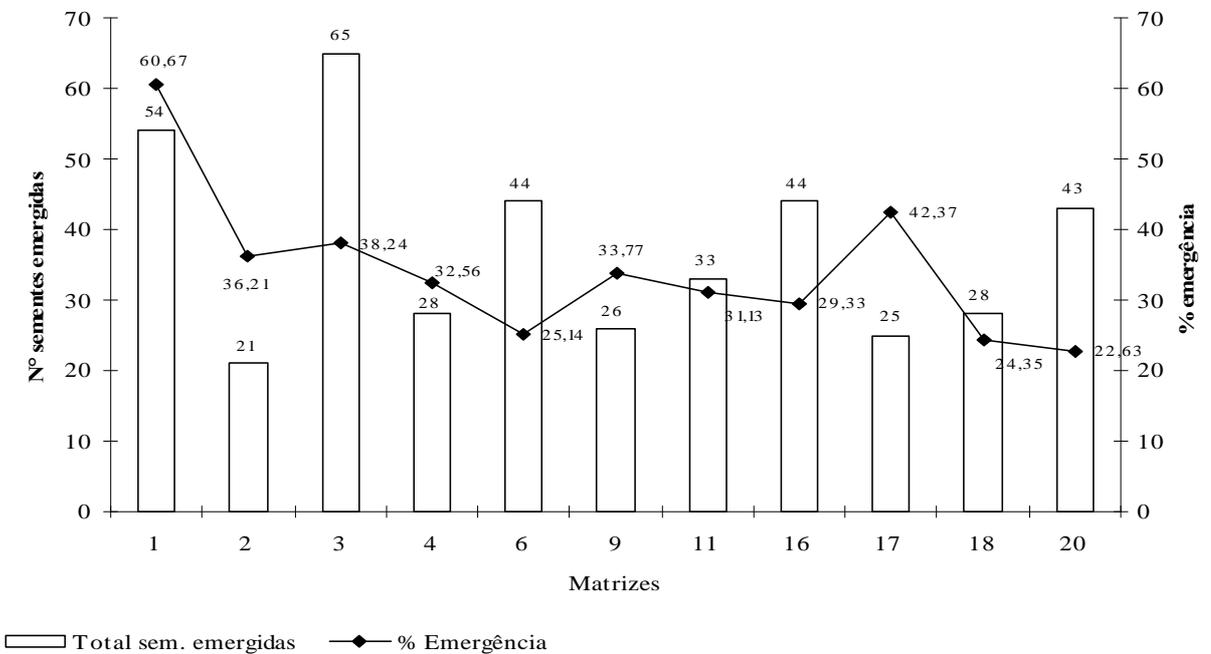


Gráfico 2. % emergência e número de plântulas emergidas por matriz.

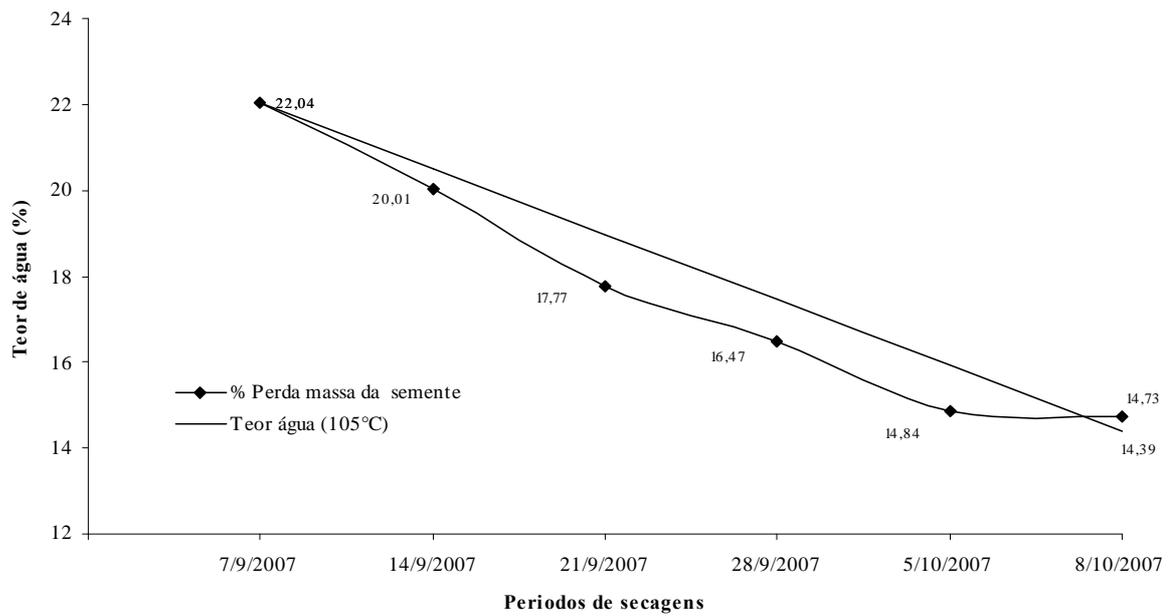


Gráfico 3. Perda de água (%) dos pirênios de tucumã durante o processo de secagem natural, determinada pelo método de estufa a 105 ± 3 °C, por 24 horas (BRASIL, 1992) e pela pesagem semanal dos pirênios.

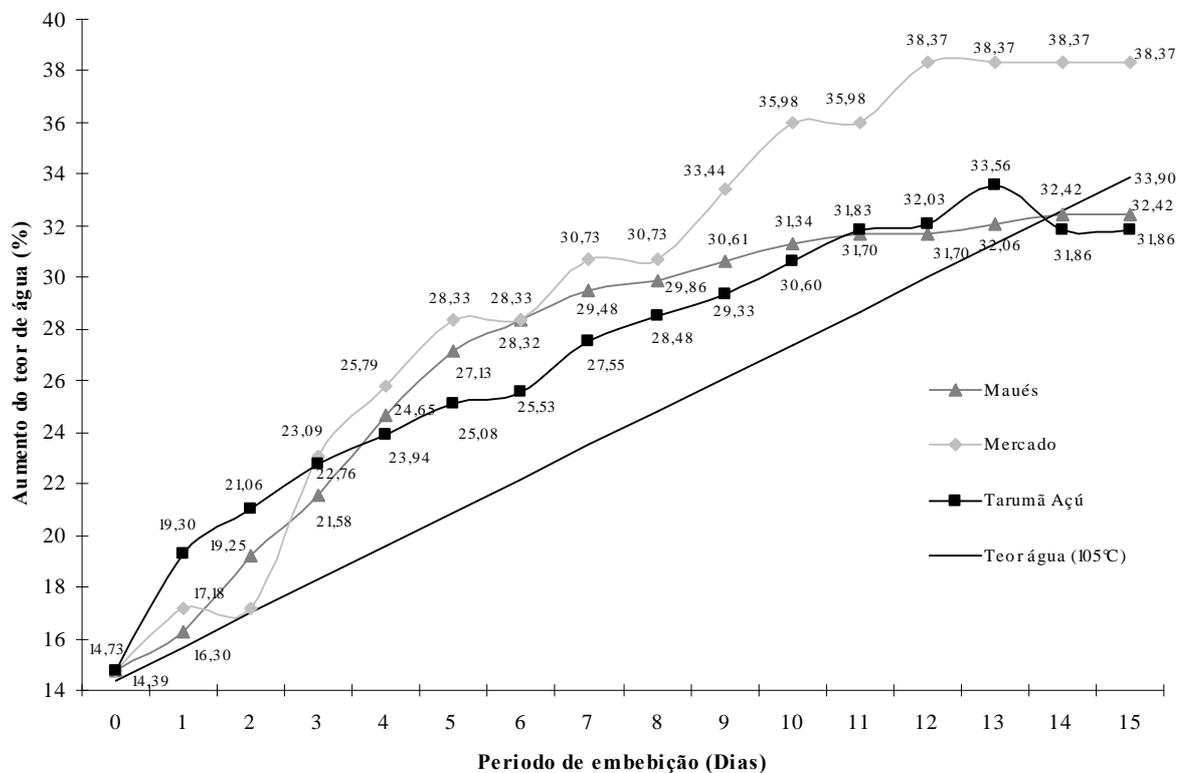


Gráfico 4. Absorção de água (%) pelas sementes de tucumã, de três procedências, durante o processo de embebição, determinada pelo método de estufa a 105 ± 3 °C, por 24 horas (BRASIL, 1992) e pela pesagem diária das sementes.

Da mesma forma que os resultados obtidos na primeira etapa do estudo de propagação, a técnica empregada nessa segunda etapa, também, obtiveram-se sementes cuja germinação se desenvolveu em três estádios: a) a emergência do pecíolo cotiledonar; b) o intumescimento do pecíolo cotiledonar e; c) o surgimento da raiz primária, conforme descrito por Gentil e Ferreira (2005).

Após a embebição, efetuava-se uma triagem semanal das sementes dos tratamentos avaliados. Como já mencionado, não se efetuou tratamento das sementes com fungicidas nessa etapa. Assim, durante o processo de germinação, constatou-se que todas as combinações que continham as sementes provenientes da mistura coletada no mercado foram excessivamente contaminadas por microorganismos, o que resultou na eliminação de 100% desse tratamento, fato que pode ser explicado pela possível origem do lote das sementes e pelos diferentes estádios de maturação que as mesmas se encontravam. Por outro lado, constatou-se que as sementes provenientes das outras duas procedências, de uma planta da população do Tarumã-Açú e das plantas da população de Maués, germinaram em sua totalidade aos 49 e aos 21 dias, respectivamente para cada tratamento (Tabela 6).

O tempo médio para atingir a germinação máxima - período transcorrido entre a embebição e a emergência do pecíolo cotiledonar – das sementes provenientes de Maués e Tarumã-Açú foi de 26,9 e 45,3 dias, respectivamente, utilizando o método proposto por Edmond e Drapala (1958) *apud* Silva e Nakagawa (1995). No estudo realizado por Gentil e Ferreira (2005), o tempo médio de germinação das sementes foi de 99 dias. Um ano depois, Ferreira e Gentil (2006), realizando outro estudo, obtiveram um tempo médio de germinação das sementes de 104 dias. Presumiram que as prováveis causas para a germinação desuniforme estavam relacionadas à origem do lote de sementes que utilizaram no estudo - formado de uma mistura de sementes obtidas no mercado - ou ao tempo de embebição das sementes. Nesse estudo, que foi realizado em duas etapas, constatou-se que o tempo de

embebição das sementes foi o principal fator que influenciou na velocidade e na sincronização da germinação das sementes de tucumã. Na primeira etapa do estudo, as sementes foram submetidas a quatro dias de embebição e levaram 269 dias para germinarem completamente (Tabela 5). Na segunda etapa, pelo monitoramento diário da absorção de água pelas sementes até atingirem um ponto máximo de absorção, que se verificou entre o 14º e 15º dia após o início do processo de embebição (Gráfico 4), as sementes apresentaram uma percentagem de germinação que variou entre 60% e 85% (Gráfico 5), nos tratamentos avaliados.

Tabela 6. Frequência da germinação das sementes de tucumã em função da procedência.

Procedência	Tratamentos	31/10/2007	7/11/2007	14/11/2007	21/11/2007	28/11/2007	5/12/2007	12/12/2007
Tarumã-Açú	T1	2	2	3	4	2		2
	T2		1	1	4	1	4	2
	T3	1	4	4	1	1	2	1
	T4	2		4	2	2		3
	T5	3	1	2	3	2		1
	T6		2	2	4	1	4	2
	T7	1	1	2	4	1	1	2
	T8		1	1	4	2	4	2
	T9		2	1	3	2	3	2
	T10			3	2	2	5	3
Maués	T11	8	5	4				
	T12	8	5	3				
	T13	9	5	3				
	T14	9	6	2				
	T15	9	4	3				
	T16	7	5	5				
	T17	8	7	2				
	T18	7	5	5				
	T19	9	5	3				
	T20	9	6	2				

Ferreira e Gentil (2006), em seus estudos, obtiveram 58% de germinação do tucumã no tratamento com sementes não embebidas em água, e um máximo de 70% de germinação com sementes submetidas a nove dias de embebição. Naquelas sementes submetidas a 15 dias de embebição, esses autores obtiveram 64% de germinação. Constataram que o tempo médio de germinação decresceu à medida que aumentou o período de embebição.

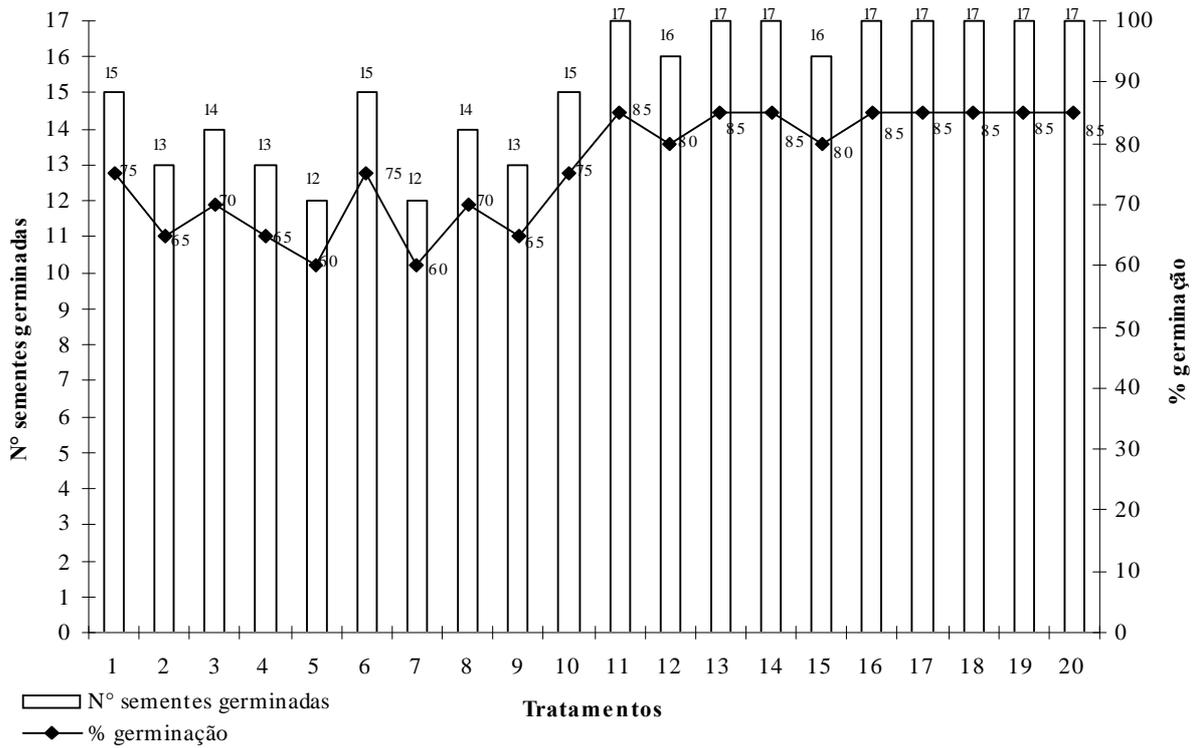


Gráfico 5. Número de sementes germinadas e percentagem de germinação, por tratamento, para *A. aculeatum*.

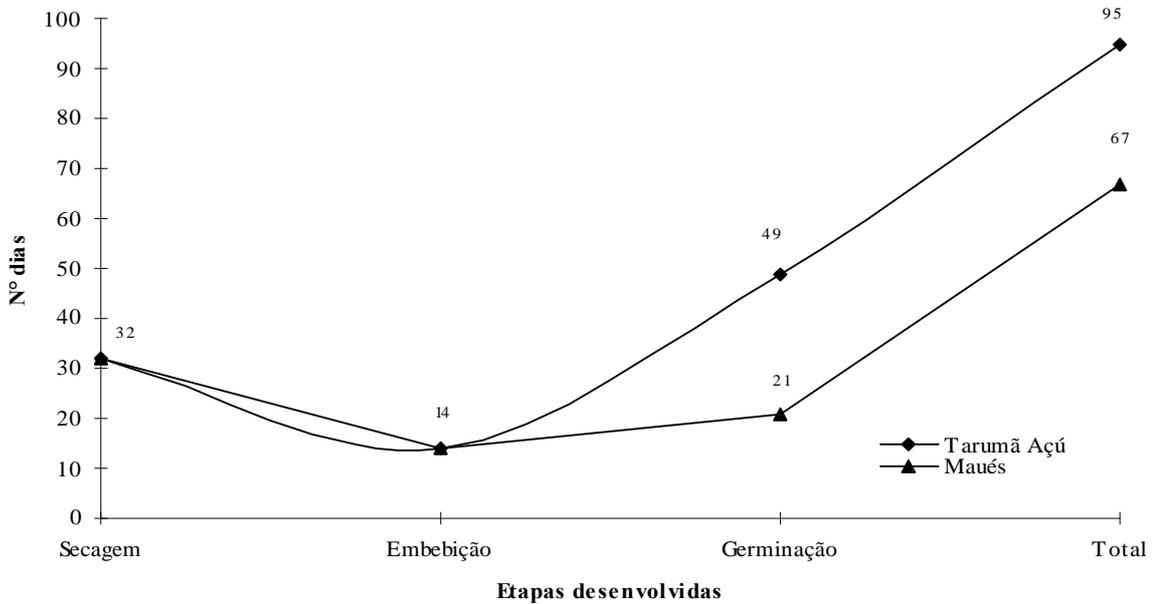


Gráfico 6. Número de dias verificados nas etapas do processo de secagem natural, embebição e germinação de *A. aculeatum*.

Nesse estudo, observou-se que as sementes quando alcançaram um nível máximo de absorção de água apresentaram melhor resposta na percentagem de germinação e na velocidade média de germinação (Gráfico 6). Nessa etapa do estudo, as sementes que não germinaram foram aquelas eliminadas durante o processo de germinação por terem sido danificadas fisicamente ou por terem sido infectadas por fungos.

Um dos objetivos dessa etapa do estudo foi avaliar se a procedência das sementes influenciava na germinação das mesmas. Na Tabela 7, são apresentados o resumo da análise de variância (ANOVA) de todos os fatores avaliados e suas combinações sobre a variável dependente percentagem de germinação. Foi constatado que dos fatores avaliados somente a procedência das sementes influenciou significativamente na percentagem de germinação, demonstrando que a origem das sementes é um fator que deve ser levado em consideração quando se deseja obter bons índices de germinação com sementes de tucumã, sobretudo, velocidade e uniformização. Considerando-se os locais de procedência (Tabela 8), verificou-se que as sementes provenientes de plantas de Maués apresentaram uma percentagem de germinação (84%) significativamente maior do que àquela verificada nas sementes provenientes da planta da população do Tarumã-Açú (68%). Esses resultados indicam claramente que a procedência das sementes exerce grande influência na velocidade e na uniformização da germinação do tucumã. Contudo, há necessidade de se desenvolver novos estudos sobre esse aspecto, buscando-se elucidar quais os fatores intrínsecos da semente e os extrínsecos que determinam esse comportamento.

Não se constataram efeitos significativos dos tratamentos com frequência de troca de água e choques de temperatura sobre a percentagem de germinação das sementes de tucumã, indicando que esses fatores, da forma como foram aplicados, não contribuíram para acelerar e nem uniformizar a germinação das sementes de tucumã (Tabela 7).

Tabela 7. Resumo da análise de variância para a variável percentagem de germinação.

Causas da variação	G.L.	Q.M.
Tratamentos	29	0,465 **
Procedência das sementes	2	6,688 **
Frequência de troca de água	1	0,004
Choques de temperatura	4	0,007
Procedência das sementes * Frequência de troca de água	2	0,001
Procedência das sementes * Choques de temperatura	8	0,005
Frequência de troca de água * Choques de temperatura	4	0,004
Procedência das sementes * Frequência de troca de água * Choques de temperatura	8	0,003
Erro	570	0,021
Total	599	

** = Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo Teste F-Snedecor.

CV= 7,99

Tabela 8. Efeito da procedência das sementes sobre a variável percentagem de germinação.

Procedência das sementes	Médias (%) e nível de significância*
Maués	84,0 A
Tarumã-Açú	68,0 B
Mercado	00,0 C

*Médias comparadas pelo Teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.2 Sistema de cruzamento do tucumã

Os oito *locus* de microsátélites utilizados para estimar os parâmetros do sistema reprodutivo demonstraram que a taxa de cruzamento *multilocus* (t_m), a partir da qual as progênes foram originadas, foi de 0,978 tanto pelo método de EM e NR, sugerindo que a espécie se reproduz por um sistema misto de reprodução com predomínio de fecundação cruzada ou exocruzamento (Tabela 9). Altas estimativas de cruzamento têm sido encontradas para outras palmeiras, como *A. mexicanum* (EGUIARTE *et al.*, 1992) e *Euterpe edulis* (CONTE, 2003). A taxa de cruzamento individual (t_s) por progênie não aparentada (Tabela 9), também foi alta, com valores de 0,978 (EM) e 0,984 (NR). A diferença entre a taxa de cruzamentos entre aparentados ou entre *multilocus* e *unilocus* ($t_m - t_s$), que auxilia o

incremento da endogamia dentro das populações, apresenta valores de -0,001 (EM) e -0,007(NR), ou seja, foi praticamente zero (Tabela 9), o que evidencia a ausência de acasalamento entre os parentes da população de tucumãzeiros avaliada. Freitas *et al.* (2004), Gaiotto *et al.* (2003) e Ritland e Jain (1981) sugerem para este resultado uma ausência de endogamia biparental, corroborando com os resultados obtidos nesse estudo, onde a autofecundação ($\hat{s} = 1 - \hat{t}_m$) apresentou uma taxa muito baixa, que foi de 0,022 para os métodos de EM e NR. De acordo com Ritland (2002), para baixos níveis de autofecundação ($s < 0,2$), a correlação de t entre *locus* (r_s) corresponde à fração de endogamia devido à endogamia uniparental e à fração de autofecundação devido à endogamia biparental ($1 - r_s$). Sendo assim, a baixa endogamia ou autofecundação que foram detectadas no estudo, categorizadas em cruzamentos uniparentais e biparentais, foi de 0,898 para EM e 1,200 no método NR nos uniparentais, e de 0,102 no EM e de -0,200 no método NR nos biparentais (Tabela 9). Considerando-se o erro padrão da média entre os *locus*, as famílias apresentam uma taxa de cruzamento *multilocus* (tm) superiores a 1,0, porém as famílias 1, 5 e 11 da população avaliada apresentam um tm abaixo de 1,0 pelo método MME (Tabela 9).

A estimativa da taxa de correlação da autofecundação (r_t) entre as progênes das matrizes avaliadas foi de 0,276 e 0,444 para os métodos de EM e NR, respectivamente. Este resultado demonstra uma significativa variação na taxa de cruzamento entre plantas na população de tucumã avaliada, evidenciando a existência de certo desvio ou variação na homogeneidade da estimativa da taxa de cruzamento individual. Seoane *et al.* (2005) argumentam que correlações significativas de autofecundações ou variações na taxa de cruzamento individual, podem ser um indicativo da existência de variações na auto-incompatibilidade entre as plantas. Esses mesmos autores destacam que outros fatores, como populações estruturadas em famílias e assincronismo no florescimento, podem contribuir ou causar a ocorrência de variações na taxa de cruzamento individual. Para Gaiotto *et al.* (2003)

e Moura (2005) a correlação de autofecundação corresponde à probabilidade de encontrar um indivíduo gerado por autofecundação em uma progênie onde exista outro também gerado por autofecundação. Porém, as estimativas de r_t revelam que os indivíduos oriundos de autofecundação encontram-se aleatoriamente distribuídos entre as progênies e sugerem que não há tendência de algumas plantas maternas gerarem mais indivíduos por autofecundação ou cruzamentos do que outras (MOURA, 2005).

A correlação da paternidade (r_p) mede a proporção de indivíduos de cruzamentos que foram gerados por cruzamentos biparentais, ou seja, irmãos completos (MOURA, 2005; RITLAND, 1989). As correlações de paternidade em *A. aculeatum* foram baixas, de 0,176 (EM) e 0,205 (NR), revelando que o processo de polinização cruzada foi aleatório com poucos cruzamentos biparentais. Este resultado também indicou que a maioria de progênies do tucumã avaliadas foi oriunda de cruzamentos por diferentes fontes de pólen, o que corresponde ao número de doadores de pólen ($1/r_p$) para o tucumã, apresentando valores de 5,682 (EM) e 4,878 (NR) indivíduos que contribuíram com o pólen no evento de reprodução de uma planta-mãe (Tabela 9). Neto *et al.* (2005) argumentam que si existem “n” indivíduos reprodutivos em uma área e que cada um tem a mesma probabilidade de ser o parental masculino (doador de pólen) no cruzamento com uma planta-mãe e se os cruzamentos forem independentes (envolvem visitas separadas de polinizadores) então, a probabilidade de que um indivíduo polinizador cruze duas vezes é $1/n$, assim, o número efetivo de polinizadores é $1/r_p$. Seoane *et al.* (2005) identificaram entre 4,5 e 9 doadores de pólen para *Euterpe edulis* e Rodrigues (2006) estimou que o número de doadores de pólen de *Bactris gasipaes* variou de 9 a 20. Porém, as baixas estimativas de correlação de paternidade implicam em um maior número de doadores de pólen (RITLAND, 1989). Essas baixas estimativas de correlação de paternidade sugerem que o número de cruzamentos correlacionados ($t_m \times r_p$) apresenta 0,172

(EM) e 0,200 (NR) de progênies dentro das famílias eram parentes no grau de irmãos-completos e conseqüentemente o número de cruzamentos aleatórios $[t_m(1-r_p)]$ é alto, apresentando 0,806 (EM) e 0,778 (NR) eram meios-irmãos. Neto *et al.* (2005) destacam que os cruzamentos correlacionados (autofecundação) são causados pelo comportamento dos polinizadores que visitam de forma sistemática árvores próximas. Outro dado que confirma este resultado da correlação de paternidade é o baixo cruzamento biparental ($t_m - t_s$).

O índice de fixação parental (F) estimado para as famílias foi de 0,0 (EM) e -0,112 (NR), indicando presença de alogamia e ausência de endogamia nesta população (Tabela 9). Ritland e Jain (1981) explicam que o valor negativo do F , pelo método NR, é decorrente da frequência dos genótipos heterozigotos observados acima da esperada e que o método EM não permite estimativas negativas do F . Para a espécie *Malpighia emarginata*, Lopes (1999), identificou valores de 0,0 (EM) e -0,421 (NR) para o índice de fixação de aceroleira, o que comprovou não ocorrer endogamia na população dessa espécie.

O coeficiente médio de coancestria dentro de progênies (θ_{xy}), estimado para as progênies das famílias, foi de 0,133 (EM) e 0,119 (NR), valor considerado próximo ao esperado em progênies de meios-irmãos (0,125), confirmando os resultados anteriores dos cruzamentos correlacionados e aleatórios. Freitas *et al.* (2004) ressaltam que o coeficiente de coancestria assume valores de 0,125 em progênies de meios-irmãos; de 0,25 em progênies de irmãos-completos e de 0,5 em progênies de irmãos de autofecundação. Este coeficiente é uma medida de parentesco que mede a probabilidade de se amostrarem aleatoriamente dois alelos em dois indivíduos e eles serem idênticos por descendência (NETO *et al.*, 2005). A coancestria nas progênies da população em estudo significa que existem 13,3 % (EM) ou 11,9%(NR) de probabilidade, de se amostrar dois alelos em dois indivíduos de mesma progênie e eles serem idênticos por descendência. Esta baixa coancestria nas progênies de *A.*

aculeatum é consequência do sistema de reprodução, mais especificamente dos cruzamentos por alogamia.

O conhecimento do coeficiente de coancestria também é importante na estimativa do tamanho efetivo de variância ($\hat{N}_{e(v)}$). Para Neto *et al.* (2005) o tamanho efetivo da variância mede a representatividade genética de progênies em relação à população de referência ou parental. Em amostras de estruturas de progênies de tamanho infinito, o tamanho efetivo de variância assume valores entre um (1) e quatro (4); sendo valor 1 (um) para progênie de autofecundação; 2 (dois) para progênies de irmãos-completos e 4 (quatro) para progênies de meios-irmãos. Assim, em progênies de populações perfeitamente panmíticas (alogâmicas), o tamanho efetivo de variância atinge seu valor máximo de quatro (NETO *et al.*, 2005). A estimativa do tamanho efetivo de variância de cada uma das progênies de *A. aculeatum* foi alta, 3,748 (EM) e 4,188 (NR), indicando que a representatividade genética na descendência é próximo à esperada em progênies de cruzamentos aleatórios o que reforça, mais uma vez, a hipótese de que as progênies são compostas predominantemente por meios-irmãos. Neto *et al.* (2005) manifestam a importância desta estimativa para a determinação de tamanhos amostrais em programas de melhoramento, conservação genética e para coleta de sementes visando à recuperação ambiental, bem como, para o monitoramento da variabilidade genética em populações sob manipulação.

Tabela 9. Estimativas de endogamia, parentesco e sistema de reprodução de uma população de *A. aculeatum*.

Estimativa	Taxa de cruzamento	
	Método de MME	
Família 1 - t_m	0,948 (0,149) [25]	
Família 2 - t_m	1.036 (0.052) [21]	
Família 3 - t_m	1.038 (0.013) [25]	
Família 4 - t_m	1.046 (0.032) [25]	
Família 5 - t_m	0.986 (0.098) [25]	
Família 6 - t_m	1.055 (0.012) [25]	
Família 7 - t_m	1.090 (0.000) [25]	
Família 8 - t_m	1.022 (0.051) [25]	
Família 9 - t_m	1.283 (0.035) [24]	
Família 10 - t_m	1.111 (0.110) [25]	
Família 11 - t_m	0.774 (0.171) [25]	
	Método EM	Método NR
Taxa de cruzamento multilócus - t_m	0,978 (0,024)	0,978 (0,077)
Taxa de cruzamento unilócus - t_s	0,978 (0,019)	0,984 (0,035)
Endogamia biparental - $t_m - t_s$	-0,001 (0,023)	-0,007 (0,070)
Correlação da estimativa de $t - r_t$	0,276 (0,071)	0,444 (0,320)
Correlação da estimativa de p multilócus - r_p	0,176 (0,037)	0,205 (0,044)
Correlação de t entre lócus - Fração de autofecundação devido endogamia uniparental - r_s	0,898 (0,003)	1,200 (0,500)
Fração de autofecundação devida Endogamia biparental - $1 - r_s$	0,102	-0,200
Número de doadores de pólen - $1/r_p$	5,682	4,878
Taxa de autofecundação - $\hat{s} = 1 - \hat{t}_m$	0,022	0,022
Índice de fixação parental - F	0,000 (0,000)	-0,112 (0,055)
Coancestria dentro das progênes - θ_{xy}	0,133	0,119
Tamanho efetivo de variância - $\hat{N}_{e(v)}$	3,748	4,188

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

4 CONCLUSÕES

- Os pirênios de tucumã submetidos ao processo de secagem natural levam, em média, um mês para desprender as sementes do endocarpo, onde se verifica uma redução total no teor de água;
- Depois de imersas, e trocando-se a água a cada 24 horas, o tempo necessário para que as sementes de tucumã reidratem completamente é de 15 dias, período onde se verifica um aumento no teor de água das sementes;
- As sementes de tucumã germinam completamente, em um prazo máximo de 50 dias, apresentando uma percentagem de germinação que varia entre 60 a 85%, depois de haverem sido reidratadas em água por 15 dias;
- Iniciado o processo de germinação, são necessários, em média, 208 dias para se obter uma plântula de tucumã com a primeira folha completa;
- O intervalo de tempo necessário para a secagem natural, a reidratação e a germinação completa de um lote de sementes de tucumã situa-se entre 67 a 95 dias;
- A procedência das sementes exerce grande influência na velocidade e na uniformização da germinação do tucumã;
- A estimativa dos parâmetros do sistema de cruzamento obtida nesse estudo determinou que *Astrocaryum aculeatum* è uma espécie predominantemente alógama; com 96,8% de exocruzamento e uma taxa de autofecundação de 3,2%.
- As altas taxas de fecundação cruzada ou exocruzamento verificado na população de tucumãzeiro avaliada resultou em progênies, predominantemente, compostas por meio-irmãos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Blücher, 1971. 381 p.

APG II 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnaean Society**. London, v. 141, p. 399-436. 2003.

AZEVEDO, M. O., et al. **Técnicas básicas de biologia molecular**. Brasília. Editora Universidade de Brasília, 2003. 212 p.

BACELAR-LIMA, C. G.; PESSONI, L. A. Estrutura populacional do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) na Estação Ecológica de Maracá, RR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS AGROFLORESTAIS, 3, 2000, Manaus-AM. **Manejando a biodiversidade e compondo a paisagem rural**: Anais. Manaus-AM: Universidade do Amazonas - Imprensa Universitária. 2000. v. 1. p. 180-182.

_____; COLETTI-SILVA, A.; GRIBEL, R. Biologia floral e visitantes de *Astrocaryum aculeatum* Meyer (Arecaceae) em Manaus, AM, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BOTÂNICA, 54, 2003, Belém. **54º Congresso Nacional de Botânica**: Resumos., Belém: Sociedade Botânica do Brasil, 2003.

_____; MENDONÇA, M.S.; BARBOSA, T.C.T.S. Morfologia floral de uma população de tucumã *Astrocaryum aculeatum* G. Mey (Arecaceae) na Amazônia central. **Acta Amazônica**. Manaus, v. 36, n.4, p. 407-412, 2006.

BILLOTE, N., et al. A new set of microsatellite markers for the peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth): characterization and across-taxa utility within the tribe Cocoeae. **Molecular Ecology Notes**, USA. v. 4, p. 580-582, 2004.

BORÉM, A. Considerações sobre o fluxo gênico. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.34, p. 86-90. Janeiro/Junho 2005.

BRASIL - Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: CLAV/DNDV/SNAD/MA. 1992. 365 p.

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

CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Museu Paraense Emilio Goeldi. Edições CEJUP. CNPq. Belém. 1991.

CLEMENT, C. R. 1492 and the loss of Amazonian crop genetic resources. I. The relation between domestication and human population decline. **Economic Botany**, New York. v. 53, n. 2, p.188-202, 1999.

_____. Melhoramento de espécies nativas. In: NASS, L.L., et al. **Recursos genéticos & melhoramento - plantas**. Mato Grosso: Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso - Rondonópolis, 2001. p. 423-441.

COELHO, A. S. G.; VALVA, F. D'A. O processo evolutivo e o melhoramento de plantas. In: NASS, L. L., et al. **Recursos Genéticos & Melhoramento - plantas**. Rondonópolis-MT: Fundação de apoio a pesquisa agropecuária do Mato Grosso (Fundação MT), 2001, v. 3, p. 57-78.

CONTE, R. **Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidas á ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites**. 2004. 135 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queros”, Universidade de São Paulo, Brasil.

COSTA, J.R. O tucumã (*Astrocaryum aculeatum* G.F.W. Meyer): uma espécie de potencial agroflorestal para a terra firme do estado do Amazonas-Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS AGROFLORESTAIS, 3, 2000, Manaus-AM. **Manejando a biodiversidade e compondo a paisagem rural**: anais. Manaus-AM: Universidade do Amazonas - Imprensa Universitária. 2000. v. 1. p. 232-234

_____; VAN LEEUWEN, J. O uso do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) por produtores rurais em áreas alteradas e degradadas no Estado do Amazonas. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 5, 2002, Belo Horizonte - Minas Gerais. **Água e Biodiversidade**: anais de trabalhos voluntários. Belo Horizonte - Minas Gerais, Viçosa: Editora Folha de Viçosa Ltda., nov. 2002. p. 311-312.

_____; VAN LEEUWEN, J. **Relatório resumido sobre o tucumã do Amazonas (*Astrocaryum aculeatum* Meyer)**. In: Relatório parcial do projeto – desenvolvimento de sistemas agroflorestais para pequenos produtores. Manaus - AM: INPA - CNPq, 2002. 10 p. (Série Texto Técnico, Bolsa DTI-PCI).

CRONQUIST, A. **An Integrate System of Classification of Flowering Plants**. The New York Botanical Garden: Columbia University Pres - USA. 1981. 1262 p.

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

ELIAS, M. E. A., FERREIRA, S. A. N., GENTIL, D. F. O. Emergência de plântulas de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) em função da posição de semeadura. **Acta Amazônica**, Manaus-AM, v. 36, n. 3. p. 385-388. 2006.

EPALMETUM. **Classificação taxonômica do *Astrocaryum aculeatum***. Disponível em: <<http://www.epalmetum.com>>. Acesso em: 14 julho 2006.

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

FAO. **Especies forestales productoras de frutas y otros alimentos. 3. Ejemplos de América Latina**. 44(3). Rome-Italia. 1987. 241p.

FERREIRA, E. L. **Manual das Palmeiras do Acre, Brasil**. Instituto Nacional de Pesquisas/Universidade Federal do Acre. Disponível em: <http://www.nybg.org/bsci/acre/www1/manual_palmeiras.html> Acesso em: 15 julho 2006.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares RAPD e RFLP em análises Genética**. Brasília-DF: MAACA-EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220 p.

_____; GRATTAPAGLIA, D. **Introducción al uso de los marcadores Moleculares RAPD y RFLP en análisis Genética**. Brasília-DF: MAACA-EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

FERREIRA, S. A. N.; GENTIL, D. F. O. Extração, embebição e germinação de sementes de tucumã *Astrocaryum aculeatum*. **Acta Amazônica**, Manaus-AM, v. 36, n. 2. p. 141-146. 2006.

FRANCO, T. L.; HIDALGO, R. **Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos**. Cali-Colombia: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). 2003. 89 p. (IPGRI. Boletín técnico, 8)

FREITAS, M. L. M., et al. Mating system of a population of *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão using the fAFLP molecular marker. **Genetics and Molecular Biology**, Brazil, v. 27, n. 3, p. 425-431. 2004.

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**, USA, v. 94, n. 5, p. 399-406. 2003.

GENTIL, D. F. O.; FERREIRA, S. A. N. Morfologia da plântula em desenvolvimento de *Astrocaryum aculeatum* Meyer (Arecaceae). **Acta Amazônica**, Manaus-AM, v. 35, n. 3, p. 337-342. 2005.

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

HENDERSON, A.; SCARIOT, A. A Flora da Reserva Ducke, I: Palmae (Arecaceae). **Acta Amazônica**, Manaus-AM, v. 23, n. 4, p. 349-369. 1993.

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Relação: **Frutas da Amazônia**. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Disponível em: http://www.inpi.gov.br/frutas_amazonia/frutas.htm, acesso em: 15 de jul. 2006.

JARAMILLO, S.; BAENA, M. **Material de apoyo a la capacitación en conservación ex situ de recursos fitogenéticos**. Cali-Colombia: Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos (IPGRI), 2000. 128 p.

JUSTO, C. F., et al. Composição Química, Curva de Embebição e Efeito da Temperatura sobre a Germinação de Sementes de *Eugenia pyriformis* Camb. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 510-512, jul. 2007.

KAHN, F.; MILLÁN, B. *Astrocaryum* (Palmae) in Amazonia: a preliminary treatment. **Bulletin Institute Français d'Étude Andines**, França, v. 21, n. 2, p. 459-531. 1992.

KITZKE, E.D. A method for germinating *Copernicia* palm seeds. **Principes**, v. 2, n.1, p 5-8. 1958.

LI, Y. C., et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, USA, v. 11, p. 2453 – 2465. 2002.

LLERAS, E.; GIACOMETTI, D. C.; CORADIN, L. **Áreas críticas de distribución de palmas en las Americas para colecta, evaluación y conservación**. In: Informe de la reunión de consulta sobre palmeras poco utilizadas de América Tropical. Turrialba: FAO, 1983. p. 67-101.

LORENZI, H., et al. **Palmeiras no Brasil: Exóticas e Nativas**. São Paulo: Instituto Plantarum, Nova Odessa, 1996. 303 p.

LOPES, R. **Polimorfismo, sistema de acasalamento, polinizações, repetibilidade de características do fruto e avaliação de genótipos de aceroleira**. 1999. 146 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Vegetal) - Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

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

MARTÍNEZ, A. K., et al. Microsatellite loci in *Bactris gasipaes* (Arecaceae): their isolation and characterization. **Molecular Ecology**, USA, v. 2, p. 408-410, 2002.

MENDONÇA, M. S. **Aspectos morfológicos das sementes de algumas espécies de palmeiras (Arecaceae = Palmae) da Amazônia**. 1996. 68 f. Tese (Concurso de Professor Titular), Universidade do Amazonas, Manaus, Brasil.

MOURA, M. C. O. **Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish por isoenzimas e RAPD.** 2005. 165 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.

MOUSSA, F.; KAHN, F. A importância econômica do tucumãzeiro de Manaus, *Astrocaryum aculeatum*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ECOSSISTEMAS FLORESTAIS, 4, 1996, Belo Horizonte - Minas Gerais. **4 Simpósio Internacional sobre Ecosistemas Florestais: Anais de resumos**, Belo horizonte. Biosfera, 1996, p. 172.

MURRAY, M.G., THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, vol. 8, No. 19, p. 4321-4326, 1980.

NETO, J. G.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema de reprodução em *Caesalpinia echinata* Lam. implantada em arboreto experimental. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo-Brasil, v.28, n.2, p. 409-418, abr./jun., 2005.

OLIVEIRA, M. S. P. Caracterização morfológica de frutos em acessos de tucumanzeiro (*Astrocaryum vulgare* Mart.). In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3, 2001, Londrina, PR. **Anais do III Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe**, Londrina, PR: IAPAR/EMBRAPA, 2001. v. 1. p. 351-353.

_____; COUTURIER, G.; BESERRA, P. Biologia da Polinização da Palmeira Tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.). **Acta Botânica Brasileira**. São Paulo-Brasil. v. 17 n. 3, p. 343-353. 2003.

QUEIROZ, M. H. Botão germinativo do palmito como indicador da germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Rio Grande do Sul-Brasil, v. 8, n. 2, p.55-59, 1986.

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

_____. A series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems. **Journal of Heredity**, USA, v. 81, p. 235-237, 1990.

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

_____. **Multilocus mating system program – MLTR Version 3.0**. Vancouver, 2004. Disponível em: <<http://genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs.html>>. Acesso em: 3 setembro de 2007.

RODRIGUES, D. P. **Diversidade genética e sistema de reprodução em progênes elites de pupunheira inerme (*Bactris gasipaes kunth*) com marcadores microssatélites: implicações para o melhoramento do palmito**. 2006. 106 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, Brasil.

_____, et al. Novel microsatellite markers for *Bactris gasipaes* (Palmae). **Molecular Ecology Notes**, USA, v. 4, n. 4, p. 575-576, 2004.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília-Brasil, n. 9, p. 40-43, Jul./Ago., 1999.

SCHROTH, G., et al. **Agroforestry and biodiversity conservation in tropical landscapes**. Washington, D.C.: Island Press, 2004. 576 p.

_____, et al. Extractive use, management and in situ domestication of a weedy palm, *Astrocaryum tucuma*, in the central Amazon. **Forest Ecology and Management**, ELZEVIER, v. 202, p. 161-179, 2004.

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

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

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

SILVA, J. B. C.; NAKAGAWA, J. Estudo de fórmulas para cálculo da velocidade de germinação. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 5, n. 1, p. 62-73, 1995.

SOUZA, A. G. C., et al. **Fruteiras da Amazônia**. Embrapa Amazônia Ocidental: Embrapa - Serviço de Produção de Informação, 1996. 204 p.

SOUZA, V. C; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia Ilustrada para Identificação das Famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, Baseados em APG II**. São Paulo, Instituto Plantarum: Nova Odessa, 2005. 639 p.

TAKHTAJAN, A. **Diversity and Classification of Flowering Plants**. USA: Columbia University Pres, 1996. 643 p.

VILLACHICA, H. **Frutales y hortalizas promisorios de la amazonia**. Lima-Perú: Tratado de Cooperación Amazonica-TCA, 1996. 358 p.

VICENTE, M. C. D.; LÓPEZ, C.; FULTON, T. **Análisis de la Diversidad Genética Utilizando Datos de Marcadores Moleculares: Módulo de Aprendizaje**. Roma-Italia: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos-IPGRI, 2004.

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

WANG, Z., et al. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin-Germany, v. 88, p. 1-6, 1994.

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