

# **Seminário de Pós-Graduação na Embrapa Amazônia Ocidental: Integrando Esforços para o Desenvolvimento da Amazônia**

*Cleci Dezordi*  
*Wenceslau Geraldes Teixeira*  
Editores-Técnicos



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Amazônia Ocidental  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# **Seminário de Pós-Graduação na Embrapa Amazônia Ocidental: Integrando Esforços para o Desenvolvimento da Amazônia**

*Cleci Dezordi  
Wenceslau Geraldes Teixeira*  
Editores-Técnicos

*Embrapa Amazônia Ocidental  
Manaus, AM  
2008*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Amazônia Ocidental**

Rodovia AM-010, Km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara

Caixa Postal 319, 69010-970, Manaus - AM

Fone: (92) 3303-7800

Fax: (92) 3303-7820

www.cpa.embrapa.br

**Comitê Local de Publicações**

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*

Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Membros: *Carlos Eduardo Mesquita Magalhães*

*Cheila de Lima Boijink*

*Cintia Rodrigues de Souza*

*José Ricardo Pupo Gonçalves*

*Luis Antonio Kioshi Inoue*

*Marcos Vinícius Bastos Garcia*

*Maria Augusta Abtibol Brito*

*Paula Cristina da Silva Ângelo*

*Paulo César Teixeira*

*Regina Caetano Quisen*

Revisor de texto: *Síglia Regina dos Santos Souza*

Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol Brito*

Diagramação e arte: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Webdesign: *Doralice Campos Castro*

1ª edição (2008): 50 CDs

**Todos os direitos reservados.**

**A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).**

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.**

**Embrapa Amazônia Ocidental.**

---

Seminário de Pós-Graduação na Embrapa Amazônia Ocidental (1. : 2008 : Manaus).

Integrando esforços para o desenvolvimento da Amazônia / editores Cleci Dezordi e Wenceslau Geraldes Teixeira. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008.

124 p.

ISBN 978-85-89111-05-8

1. Pesquisa. 2. Congresso. I. Dezordi, Cleci. II. Teixeira, Wenceslau Geraldes. III. Título.

---

CDD 630.72

© Embrapa 2008

# Editores

**Cleci Dezordi**

Bolsista CNPq, Embrapa Amazônia Ocidental,  
Manaus, AM, cleci.dezordi@cpaa.embrapa.br

**Wenceslau Geraldes Teixeira**

Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Física e Manejo do  
Solo, pesquisador da Embrapa Amazônia Ocidental,  
Manaus, AM, wenceslau@cpaa.embrapa.br

# Sistema Reprodutivo do Tucumã-do-Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*, Meyer)

S. L. F. Ramos<sup>1</sup>; M. T. G. Lopes<sup>2</sup>; J. L. V. de Macêdo<sup>3</sup>; D. P. Rodrigues<sup>4</sup>;  
R. N. V. da Cunha<sup>3</sup>; R. Lopes<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Eng. Agr., M.Sc., Bolsista CNPq, Faculdade de Ciências Agrárias; Universidade Federal do Amazonas (Ufam), Campus Universitário, Manaus, AM, slfr03@hotmail.com; <sup>2</sup>Eng. Agr., M.Sc., Dra., Faculdade de Ciências Agrárias, Ufam; mtglopes@ufam.edu.br; <sup>3</sup>Pesquisador da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, jeferson.macedo@cpaa.embrapa.br; ricardo.lopes@cpaa.embrapa.br, raimundo.nonato@cpaa.embrapa.br; <sup>4</sup>Bióloga., M.Sc., Dr., Faculdade de Ciências Biológicas, Ufam, prdoriane@ufam.edu.br.

Apoio: Embrapa Amazônia Ocidental, CNPq, Fapeam, ATU-Inpa.

## Resumo

O tucumã-do-amazonas (*Astrocaryum aculeatum* G. Meyer) é uma palmeira nativa, não domesticada, com grande variabilidade nas suas características morfológicas, constituindo-se em recurso genético para o melhoramento. O objetivo deste trabalho foi estudar o sistema reprodutivo do tucumã-do-amazonas, empregando marcadores microssatélites. Coletaram-se amostras de folíolos e frutos maduros de 11 plantas (matrizes) de uma população de tucumãzeiros. Os frutos constituíram as sementes para o estudo de propagação e de produção de plântulas para complementação do estudo de reprodução. As amostras de folíolos das matrizes e das plântulas foram utilizadas para o estudo do sistema de reprodução. Constatou-se que a germinação das sementes variou de 43,68% a 86,52%. No estudo do sistema reprodutivo, a taxa de cruzamento uniloco ( $t_u=0,978$ ) e multilocos ( $t_l=0,978$ ) indica que a espécie é predominantemente alógama. A correlação de paternidade ( $r_o=0,176$ ) demonstra que as progênies são constituídas principalmente por meios-irmãos.

**Palavras-chave:** propagação, marcadores moleculares, taxa de cruzamento.

## Introdução

O tucumã-do-amazonas (*A. aculeatum*) é uma palmeira nativa da América do Sul, encontrada nos Estados do Acre, do Mato Grosso, de Rondônia e principalmente do Amazonas, provável centro de origem (SOUZA et al., 1996). A ocorrência dessa espécie é comum em áreas desmatadas ou que sofreram alguma ação antrópica. A polpa do fruto é muito apreciada como alimento pela população da Região Amazônica (COSTA e VAN LEEUWEN, 2002). A espécie é explorada quase exclusivamente de forma extrativista, porém as populações espontâneas apresentam grande variabilidade nas características morfológicas, constituindo fonte de recursos genéticos para uso atual ou potencial no melhoramento genético.

Nos últimos anos, os marcadores moleculares têm sido empregados no estudo do sistema reprodutivo de diversas espécies vegetais, fornecendo informações sobre modo de reprodução, estimativas dos parâmetros do sistema misto de cruzamento, da taxa de cruzamento e da taxa de autofecundação, parâmetros importantes para programas 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.

O objetivo deste trabalho foi estudar o sistema reprodutivo do tucumã empregando a técnica de marcadores microssatélites (SSR – seqüências simples repetidas) como subsídios ao pré-melhoramento da espécie.

## Material e Métodos

### Coleta do material

De 11 plantas (matrizes) provenientes de uma população espontânea de *A. aculeatum*, foram coletados os folíolos, para o estudo do sistema de cruzamento, e os frutos maduros (sementes), para o estudo de propagação, formação de plântulas e realização de coleta de folíolos de 25 plântulas selecionadas de cada uma das 11 progênies; entretanto, as progênies dois e nove apresentaram 21 e 24 plântulas respectivamente, perfazendo um total de 270 plântulas.

No laboratório de dendê e agroenergia da Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus, AM), os frutos foram despulpados, e os pirênios (sementes com endocarpo), colocados em ambiente natural sob sombra, para secagem. Após o desprendimento da semente do endocarpo, extraíram-se as sementes com auxílio de uma prensa de bancada (morsa).

Os folíolos coletados das 11 matrizes e das 270 plântulas foram colocados em sacos plásticos tipo *zip lock*, previamente identificados e contendo sílica gel. Em seguida foram encaminhados ao laboratório de biotecnologia da Universidade Nilton Lins para a extração do DNA genômico.

### Propagação de tucumã-do-amazonas

As sementes das matrizes foram colocadas em sacos plásticos transparentes perfurados em toda sua extensão e mergulhados em

tanques com água, que era trocada diariamente, para iniciar a embebição, durante quatro dias. Em seguida, as sementes foram colocadas em sacos plásticos transparentes identificados, preenchidos com ar e amarrados na abertura, e foram deixadas em uma sala para iniciar o processo de germinação. Três a quatro vezes por semana efetuava-se triagem, retirando as sementes germinadas e eliminando as contaminadas. A germinação permitiu detectar os quatro primeiros estádios de germinação do *A. aculeatum*, conforme descrito por Gentil e Ferreira (2005).

As sementes germinadas eram identificadas e levadas para um viveiro coberto com sombrite 50%, onde eram semeadas em tubetes com substrato comercial "Plantmax". Após a emergência, as plântulas que apresentavam de três a quatro folhas bifidas 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), ao qual foram adicionados mais 1,5 kg m<sup>-3</sup> de calcário dolomítico e 1,0 kg m<sup>-3</sup> de superfosfato triplo.

### Sistema de cruzamento do tucumã

#### Extração do DNA

Utilizou-se o método CTAB (MURRAY & THOMPSON, 1980), sendo retirados 100 mg de tecido foliar de cada uma das 281 amostras, as quais foram fragmentadas em pedaços bem pequenos e colocadas no gral de porcelana. Adicionaram-se 800 µL de detergente de extração de brometo de cetiltrimetilamônio 2X (CTAB), para ser macerada. O produto resultante foi colocado em tubos de ensaio tipo *appendorf*, de 1,5 ml. Em seguida, acrescentaram-se 2 µL de 2-β-mercaptoetanol. Os tubos foram incubados em banho-maria a 60°C, durante 30

minutos. Logo, adicionaram-se 600  $\mu\text{L}$  de clorofórmio e álcool isoamílico (CIA). Depois os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 12 minutos. Posteriormente, pipetou-se a fase aquosa de cada uma das amostras, as quais foram depositadas em outros tubos *appendorf*. Adicionaram-se, em seguida, 400  $\mu\text{L}$  de isopropanol frio ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) à solução aquosa e misturou-se, para permitir a precipitação do DNA. O material foi incubado por 12 horas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, foram centrifugados a 7.500 rpm por 10 minutos, permitindo identificar o DNA precipitado (*pellet*). Depois realizou-se a eliminação do isopropanol e, em seguida, acrescentou-se, por duas vezes, 1 mL de etanol absoluto a 70% ao *pellet* de cada amostra por 10 minutos. Posteriormente, colocou-se 1 ml de etanol absoluto a 100% por três minutos, e deixou-se secar na capela por meia hora. O *pellet* foi combinado com 75  $\mu\text{L}$  de uma solução tampão TE (Tris-HCl e EDTA) acrescido de RNase. Esta foi incubada por 2 horas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  e *vortexada* de 30 em 30 minutos para a digestão do RNase. O material final foi armazenado.

### Quantificação e diluição do DNA

No laboratório de genética do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, foi realizada a quantificação do DNA em gel de agarose 0,8% (p/v) por comparações visuais de sua fluorescência com padrões de massa molecular de DNA do fago lambda. O DNA *stock* quantificado, foram diluídos a uma concentração de 10 ng de DNA/ $\mu\text{L}$  em água mili-q.

### Amplificação dos loci SSR no DNA de tucumã

Foram amplificados oito pares de *primers* (mBg: 41, 58, 62, 66, 77 e 91. Bg: 17 e 55. Desenvolvidos por Billote et al. (2004) e Martinez et al. (2002), respectivamente, para a genotipagem do tucumã. Adicionou-

se ao *primer forward* de todos os *locus* a seqüência M13, segundo o protocolo descrito por Schuelke (2000) com algumas modificações.

### Reação de polimerase em cadeia (PCR), Diluição e genotipagem dos locus

Apresentou volumes de 0,8  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  mili-Q; 1,0  $\mu\text{L}$  do buffer Tp10X; 1,0  $\mu\text{L}$  de mix dNTP (20  $\mu\text{L}$  de cada dNTP mais 720  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  mili-Q); 1,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM); 1,0  $\mu\text{L}$  de *primer reverse* (2,5 mM); 0,5  $\mu\text{L}$  de *primer forward* (2,5 mM); 0,5  $\mu\text{L}$  de *primer* fluorescente M13 (5 mM); 0,2  $\mu\text{L}$  do LGC Biotecnologia Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ); e 4,0  $\mu\text{L}$  de DNA (10 ng).

O programa consistiu na desnaturação a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 min, seguida por 25 ciclos a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10s, a temperatura de anelamento do *primer* por 20s e finalmente a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30s, seguida por um ciclo de  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 min, 20 ciclos a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10s, e finalmente  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 20s, depois a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30s, finalizando com uma extensão a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 min.

Do produto das PCRs, uma parte foi diluída em uma proporção de 10%, para ser utilizada na genotipagem. Os PCRs diluídos foram visualizados em seqüenciador automático (*Mega Base 1000*). A estimativa do tamanho dos alelos, pares de bases (pb), foi realizada com o programa *Fragment Profiler* auxiliado pelo marcador de peso molecular ET-400-ROX.

### Sistema de cruzamento do tucumã

Utilizou-se o programa MLTR "*Multilocus Mating System Program*" desenvolvido por Ritland (2002), estimando: 1) a taxa de cruzamento *multiloco* ( $t_m$ ) da população; 2) a taxa de cruzamento média *uniloco* ( $t_s$ ) da população; 3) 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 4) a correlação de cruzamento ou autofecundação entre *locus* dentro das progênies ( $r_s$ ). O erro padrão das estimativas foi estimado por reamostragem *bootstrap* (RITLAND, 2004). Utilizaram-se 1.000 reamostragens entre e dentro das progênies.

## Resultados e Discussão

### Propagação

A progênie seis iniciou a germinação no quinto dia, e a progênie cinco iniciou a germinação no 24º dia, sendo esta a última a iniciar a germinação. Todas as progênies tiveram período final de germinação de 269 dias, com exceção da progênie 10, que foi de 172 dias. A desuniformidade na germinação das sementes de *A. aculeatum* também é relatada por Gentil e Ferreira (2005).

O tempo médio da germinação (aparecimento do pecíolo cotiledonar) das sementes foi bastante desuniforme, variando de 51 dias para a progênie 10 e de 102 dias para a progênie 11 (Tabela 1). Gentil e Ferreira (2005) apresentaram tempo médio de aparecimento do pecíolo cotiledonar de 99 dias.

A porcentagem de sementes germinadas variou de 43,68% para a progênie 10 e de 86,52% para a progênie 1 (Tabela 1). Esses resultados são similares aos obtidos por Ferreira e Gentil (2006), que relatam 58% de germinação (sementes não embebidas) e 70% de germinação (sementes submetidas a nove dias de embebição).

Na fase de viveiro, a emergência ocorreu em média 50 dias após a repicagem das sementes germinadas para os tubetes, e a primeira folha bífida surgiu, em média, 30

dias após a emergência do eófilo, totalizando 80 dias para se obter uma plântula com a primeira folha bífida.

**Tabela 1.** Distribuição das progênies e resultados obtidos no processo de germinação e emergência das plântulas.

Nº Progênie	Início da germinação (dias)	Tempo médio de germinação (%)	Germinação (%)	Emergência (%)
1	13	67,6	86,52	60,67
2	13	98,2	46,55	36,21
3	10	83,1	63,53	38,24
4	13	67,2	50,00	32,56
5	24	92,4	44,00	25,14
6	5	67,5	62,34	33,77
7	10	93,5	58,49	31,13
8	13	83,5	47,33	29,33
9	13	57,8	55,93	42,37
10	10	51,0	46,09	24,35
11	21	102,2	43,68	22,63
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>80,5</b>	<b>53,49</b>	<b>32,24</b>

Da embebição até a formação da primeira folha bífida, quando se considera que a plântula está morfológicamente formada, o período médio foi de 161 dias. Para Gentil e Ferreira (2005), a completa expansão da primeira folha bífida se deu, em média, 253 dias após a embebição da semente.

Verifica-se também 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 11 (22,63%).

### Sistema de Cruzamento

A taxa de cruzamento multiloco e uniloco, a partir da qual as progênies foram originadas, foi de 97,8%, sugerindo que a espécie se reproduz por sistema misto de reprodução com predomínio de fecundação cruzada. Altas estimativas de cruzamento têm sido encontradas para outras palmeiras, como *A. mexicanum* (EGUIARTE et al., 1992) e *Euterpe edulis* (CONTE, 2004).

Os resultados de autofecundação ( $\hat{s} = 1 - \hat{s}_m$ ) apresentaram taxa muito baixa, que foi de 2,2%, e essa autofecundação é distribuída entre a correlação de t entre lócus ( $r_s = 0,898$ ) que corresponde à fração de endogamia devido à endogamia uniparental e à fração de endogamia biparental ( $1 - r_s = 0,102$ ).

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). Em *A. aculeatum*, a  $r_p = 0,176$ , revelou que o processo de polinização cruzada foi aleatório com poucos cruzamentos biparentais.

## Conclusões

A estimativa dos parâmetros do sistema de cruzamento determinou que *A. aculeatum* é uma espécie predominantemente alógama, com 97,8% de exocruzamento e taxa de autofecundação de 2,2%.

As altas taxas de fecundação cruzada verificadas na população de tucumã-do-amazonas resultaram em progênies predominantemente compostas por meios-irmãos.

## Referências

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**, v. 4, p. 580-582, 2004.

CONTE, R. **Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidas à 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 Queiroz", Universidade de São Paulo, São Paulo.

COSTA, J. R.; 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. **Anais de trabalhos voluntários**. Viçosa: Folha de Viçosa, 2002. p. 311-312.

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**, v. 69, p. 217-228, 1992.

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

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

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

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, Lavras.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 19, p. 4321-4326, 1980.

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

RITLAND, K. Multilocus mating system program-MLTR Version 3.0. Vancouver, 2004. Disponível em: <<http://genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs.html>>. Acesso em: 3 set. 2007.

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

SOUZA, A. das G. C. de; SOUSA, N. R.; SILVA, S. E. L. da; NUNES, C. D. M.; CANTO, A. do C.; CRUZ, L. A. de A. **Fruteiras da Amazônia.** Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; Manaus: EMBRAPA-CPAA, 1996. 204 p. (Biblioteca Botânica Brasileira, 1).