

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

SELEÇÃO SE SEQUÊNCIAS INFORMATIVAS DE GENOMA  
CLOROPLASTIDIAL PARA ESTUDOS FILOGEOGRÁFICOS EM  
POPULAÇÕES DE TUCUMÃ-DO-AMAZONAS (*Astrocaryum aculeatum*)

BOLSISTA: AYRA SOUZA FARIA DE OLIVEIRA

MANAUS  
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL  
PIB-B/0106/2012

SELEÇÃO SE SEQUÊNCIAS INFORMATIVAS DE GENOMA  
CLOROPLASTIDIAL PARA ESTUDOS FILOGEOGRÁFICOS EM  
POPULAÇÕES DE TUCUMÃ-DO-AMAZONAS (*Astrocaryum aculeatum*)

Bolsista: Ayra Souza Faria de Oliveira  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Doriane Picanço Rodrigues

MANAUS  
2013

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO
2. MATERIAL E MÉTODOS
3. RESULTADOS
4. DISCUSSÃO
5. CONCLUSÃO
6. REFERÊNCIAS
7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

## 1. RESUMO

A grande variabilidade de características morfológicas das populações espontâneas de tucumã-do-Amazonas constitui uma fonte de genes para o melhoramento da espécie. Até o momento, informações genéticas sobre esta palmeira eram escassas, principalmente em relação à diversidade, distribuição da variabilidade e dinâmica evolutiva. Através da utilização do protocolo de extração de DNA de Doyle & Doyle (1987), com modificações, obteve-se DNA de qualidade para a amplificação de 20 pares de *primers* de segmentos de cpDNA desenvolvidos por Scarcelli *et al.* (2011), de onde destacaram-se 5 pares com significativas mutações. Através do uso de marcadores moleculares baseados em DNA de cloroplasto (cpDNA), pôde-se obter dados relevantes sobre sistemática molecular, filogeografia e genética de populações da planta, além de sequências genômicas altamente mutáveis. A obtenção dessas sequências nos permite inferir sobre o centro de diversidade e o padrão de dispersão da espécie, auxiliando o manejo sustentável da mesma e orientando futuras bioprospecções.

Palavras chave: Filogeografia, cpDNA, marcadores moleculares, *Astrocaryum aculeatum*, monocotiledôneas.

## 2. INTRODUÇÃO

Dentre as palmeiras tropicais de importância econômica na Amazônia, destaca-se o Tucumã-do-Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*, Arecaceae). Trata-se de uma cultura perene, de grande potencial para o desenvolvimento agrícola sustentável da região, ocorrendo com frequência em áreas descampadas, de solo pobre e degradado. Suas populações espontâneas apresentam grande variabilidade de características, constituindo fontes altamente significativas de genes para melhoramento. Devido à escassez de informações sobre a espécie, torna-se necessária a ampliação de estudos para o melhor conhecimento da distribuição da variabilidade genética e da dinâmica evolutiva da mesma para apoiar sua conservação e manejo.

Muitas destas informações podem ser obtidas rapidamente com o uso de marcadores moleculares de vários tipos (Souza, 2001; Ferreira *et al.*, 2007),

permitindo um grau de compreensão da variabilidade e estrutura genética das populações úteis e ainda silvestres. Dentre estes, os marcadores moleculares baseados em sequências do DNA de cloroplastos (cpDNA) têm se mostrado uma ferramenta atrativa para estudos de filogeografia (Scarcelli *et al.*, 2011), pois apresentam herança uniparental, ausência de recombinação e conteúdo gênico conservado. Todas estas características do cpDNA permitem elucidar as contribuições relativas do fluxo de sementes e pólen na estrutura genética de populações naturais pela comparação com marcador nuclear e mitocondrial (Provan *et al.*, 2001), gerando informação essencial para melhoristas e curadores de coleções de recursos genéticos.

A Embrapa Agroenergia considera o tucumã uma prioridade para P&D para determinar seu potencial como oleaginoso para atender demanda futura para biodiesel. Um projeto financiado pelo CNPq iniciou a prospecção de recursos genéticos, seleção de matrizes, transferência de microssatélites de pupunha para tucumã e estudo do sistema de reprodução (Lopes *et al.*, 2009), e esta proposta expandirá um componente deste projeto, identificando as regiões do genoma cloroplastidial que serão úteis na caracterização da variabilidade e estrutura genética do Tucumã-do-Amazonas para orientar futuras prospecções, apoiar a coleção e tentar identificar o centro de diversidade da espécie.

Portanto, o objetivo deste estudo será selecionar e caracterizar o polimorfismo de regiões codificadoras e não codificadoras de cloroplasto de monocotiledôneas em populações de Tucumã-do-Amazonas, para aplicar em estudos de filogeografia e genética de populações da espécie. Para tanto, será testada a amplificação de 20 segmentos de cpDNA disponíveis na literatura, das quais serão selecionadas duas regiões mais informativas para as análises de diversidade.

#### a. Marcadores moleculares

Os genomas de organelas, mitocondrial (mtDNA) e de cloroplasto (cpDNA), apresentam uma menor diversidade em suas sequências gênicas se comparados ao genoma nuclear e são mais afetados pela seleção por efeito carona. Devido aos baixos níveis de variação nas sequências, para se encontrar níveis úteis de variação intraespecífica, deve-se procurar regiões

mais mutáveis, como regiões não-codificadoras. (Ennos *et al.*, 1999). O mtDNA em plantas apresenta uma taxa de substituição muito baixa que reduzem sua utilidade como fonte de marcadores, sendo utilizado mais frequentemente o genoma do cloroplasto (Avice, 1998; Provan, 1999).

Por seu padrão de herança uniparental, predominantemente materna em angiospermas (Harris & Ingram, 1991), e modelos de evolução, essa molécula possui a capacidade de sinalizar eventos históricos como migrações, dispersão de sementes e hibridização que não poderiam ser obtidos apenas com marcadores nucleares (Ennos *et al.*, 1999), geralmente satisfatórios em abordagens filogenéticas.

#### b. Filogeografia

Atualmente, é de grande interesse reconstruir a história das espécies, visando entender quais foram suas respostas e adaptações, tanto na distribuição quanto geneticamente, a mudanças climáticas ocorridas no passado.

Métodos filogeográficos proporcionam os meios de se examinar padrões de distribuição de variação genética, com o potencial de distinguir aqueles causados por fluxo gênico atual entre as populações, daqueles derivados de eventos históricos. Extinção e recolonização, efeito gargalo e efeito fundador são alguns dos tipos de eventos históricos que deixam sinais genéticos nas gerações subsequentes (Hewitt, 1996, Schaal *et al.*, 1998; Dutech *et al.*, 2003).

Estudos filogeográficos mostram que algumas espécies estão geneticamente isoladas há muito tempo (Terauchi *et al.*, 1991; Hong *et al.*, 1993) e em outras, pouca ou nenhuma variação genética é encontrada (Demesure *et al.*, 1996). Estudos filogeográficos com espécies de plantas na região neotropical não são muitos se comparados às regiões temperadas. Olsen & Schaal (1999) e Olsen (2002) realizaram estudos com *Manihot esculenta* no norte e centro-oeste do Brasil, encontrando uma estrutura filogeográfica que pode ser explicada pelas alterações climáticas após a última grande glaciação e sugerem um centro de domesticação da espécie no estado de Rondônia.

### c. Estruturação genética de plantas

Estudos têm mostrado que espécies de plantas tropicais mantêm uma grande diversidade genética e que a maior parte da variação genética intraespecífica é encontrada dentro das populações (Buckley *et al.*, 1988).

Fatores que influenciam os padrões de trocas genéticas dentro e entre populações afetam diretamente a estruturação genética das populações de plantas (Schaal *et al.*, 1998), como por exemplo o sistema de cruzamento (Ritland, 1983).

Um fator de importância são os mecanismos de migração dos genes. O fluxo gênico em plantas ocorre principalmente de duas formas: por meio de movimento de sementes ou de pólen (Ennos, 1994; McCauley, 1994). As plantas apresentam uma grande variedade de mecanismos de polinização e dispersão. Assim, padrões de trocas genéticas em plantas resultam de uma complexa interação entre sistema reprodutivo e padrões de dispersão (Schaal *et al.*, 1998).

A troca genética é restrita em muitos grupos, tanto pela larga distribuição geográfica da espécie, quanto por dispersão limitada de pólen ou sementes (Ehrlich & Raven, 1969). Nesses casos, eventos históricos, como expansão, fragmentação e efeito gargalo, serão fortes fatores determinantes da estrutura genética atual dessas populações (Schaal *et al.*, 1998; Avise, 2000).

### d. Morfologia, biologia e distribuição de *Astrocaryum aculeatum*

As palmeiras tropicais nativas da Amazônia e de outras regiões tropicais da América Latina têm sido objeto de pesquisa e desenvolvimento desde o final da década de 1970, algumas atingiram o mercado moderno e outras não obtiveram sucesso (Clement *et al.*, 2005). Das espécies de grande importância econômica, destaca-se o Tucumã-do-Amazonas, uma espécie ainda não domesticada, nativa da Amazônia Central, que ocorre comumente em áreas descampadas, com solos pobres e degradados. É uma palmeira comumente encontrada em pequenas densidades no interior da floresta e, em maior número, nas áreas abertas, seguindo principalmente a ocupação humana (Cavalcante, 1991).

A polpa do seu fruto, rica em amido, óleo e betacaroteno, é muito apreciada pela população da região como alimento, sendo consumida tanto in

natura como recheio de pães e tapioca, e também processada na forma de sorvetes ou patês. Seu consumo está em franca expansão em Manaus (Kahn; Moussa, 1999; Schroth *et al.*, 2004). A demanda comercial estimulou a criação de uma cadeia de comercialização que traz tucumã de toda a região, incluindo o norte de Rondônia, leste de Acre, oeste de Pará, Roraima e até Venezuela e Guiana, para abastecer o mercado de Manaus (Costa *et al.*, 2005).

O gênero *Astrocaryum* agrupa algumas das palmeiras neotropicais mais espinhosas, com espinhos longos, pretos e afiados que chegam a 30 cm. As folhas são pinadas, em número de três a trinta, espinhosas com a superfície abaxial esbranquiçada, o que o diferencia do gênero *Bactris*. As ráquias são numerosas, suportando flores unissexuadas (Henderson *et al.*, 1995). Quase todas as suas partes são aproveitadas, seja como alimento ou para uso artesanal, medicinal e na construção de casas pelas populações do interior do Amazonas (Mendonça & Araújo, 1999; Miranda *et al.*, 2001).

O gênero em questão compreende 24 espécies amazônicas, das quais cinco pertencem ao subgênero *Pleiogynanthus* e 19 ao subgênero *Monogynanthus*, sendo *A. aculeatum* inserida no subgênero *Pleiogynanthus* (Kahn & Millán, 1992).



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### a. Material

Foram amostrados os 40 indivíduos de *A. aculeatum*, propostos pelo projeto, pertencentes à 5 localidades da Amazônia brasileira. As amostras de folhas foram selecionadas de indivíduos de populações espontâneas nas seguintes localidades: 1) Rondônia (ROa); 2) Interflúvio Norte (IN); 3) Solimões (SOL); 4) Rio Negro (RN); 5) Roraima (RR), sendo 5 amostras de cada população. A amostragem foi realizada com apoio do Projeto Evolução Aplicada aos Cultivos Amazônicos (CT/AMAZÔNIA 575588/08-0).

#### b. Extração, diluição e quantificação do DNA

Para a extração de DNA foi utilizado tecido vegetal proveniente de folhas, o qual, após a coleta, foi seco, acondicionado em recipientes contendo sílica gel e armazenado a -20°C no Laboratório de Evolução Aplicada na Universidade Federal do Amazonas. O DNA genômico total foi extraído a partir de amostras das folhas, usando o método CTAB (Doyle & Doyle, 1987), com modificações, através da utilização do disruptor celular Precells 24 (Bertin Technologies, USA) para maceração das amostras.

A quantificação do DNA genômico foi realizada por comparação com padrões de massa molecular conhecida (DNA Fago Lambda), em gel de agarose 0,8 % corado com Brometo de Etídio (Ferreira & Grattapaglia, 1998), analisados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotodocumentados com Easy Doc (Bioagency, USA). Após a quantificação, as amostras foram diluídas em água ultrapura e padronizadas a uma concentração de 10ng/μl.

#### c. Amplificação das sequências cpDNA

Foram testados para amplificação 20 pares de *primers* de segmentos de cpDNA desenvolvidos por Scarcelli *et al.* (2011) para estudos de genética de populações e filogenia em Monocotiledôneas, os quais foram selecionados com base no seu conteúdo de informação de polimorfismo para a família Arecaceae. A amplificação foi realizada via Reação em Cadeia da Polimerase – PCR, segundo Williams *et al.* (1990), num volume total de 25μl contendo 2μl de cada primer *Foward* e *Reverse* (2pmol/μl); 0,2μl de Taq DNA Polimerase (5U/μl); 1,5μl de dNTP (2,5mM/μl); 2,5 μl de Tampão 10× KCL; 2μl de BSA

(Bovine Serum Albumin)(2,5mg/μl); 1,5μl de MgCl<sub>2</sub> (25mM/μl); 3μl de DNA(10ng/μl) e 8μl de água ultrapura.

As reações foram realizadas no termociclador Veriti (Applied Biosystems, German), nas seguintes condições: (1) desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de (2) desnaturação a 94°C por 30 segundos; (3) anelamento na temperatura específica de cada primer por 30 segundos; (4) extensão a 72°C por 1 minuto, e uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos.

A amplificação dos *locus* foi confirmada pela análise de fotodocumentos de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com Brometo de Etídio e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta.

Após o ajuste das condições de PCR e o teste de amplificação dos 20 segmentos de cpDNA. Foram selecionadas cinco amostras de DNA (uma de cada localidade) para as análises de polimorfismo.

#### d. Sequenciamento dos produtos amplificados

Para o sequenciamento foram utilizados *primers* desenvolvidos por Scarcelli *et al.* (2011), selecionados nas etapas de testes de amplificação. Após a amplificação, o produto de PCR foi purificado com ExoSAP (USB, Cleveland, Ohio, USA) e utilizado na reação de sequenciamento. Para a obtenção da sequência nucleotídica final, o DNA do item anterior foi submetido a um sequenciador automático ABI (Life Technologies), seguindo a metodologia padrão do fabricante.

Após o sequenciador automático gerar as sequências nucleotídicas de cada reação, as sequências de cada indivíduo foram conferidas e editadas com o programa Geneious Trial 6.0.1.

As sequências *forward* e *reverse* de cada indivíduo foram organizadas em *Assembly*, de onde foi utilizado o consenso da sequência para alinhamento. Foram contados os polimorfismos em cada sequência e a quantidade total de pares de bases, além de demarcadas as localizações de cada variação.

#### 4. RESULTADOS

A extração do DNA genômico total de *A. aculeatum* foi realizada com sucesso, obtendo-se amostras de DNA íntegro e sem degradação, e com concentrações entre 50 a 100 ng/ $\mu$ l (Figura 1).

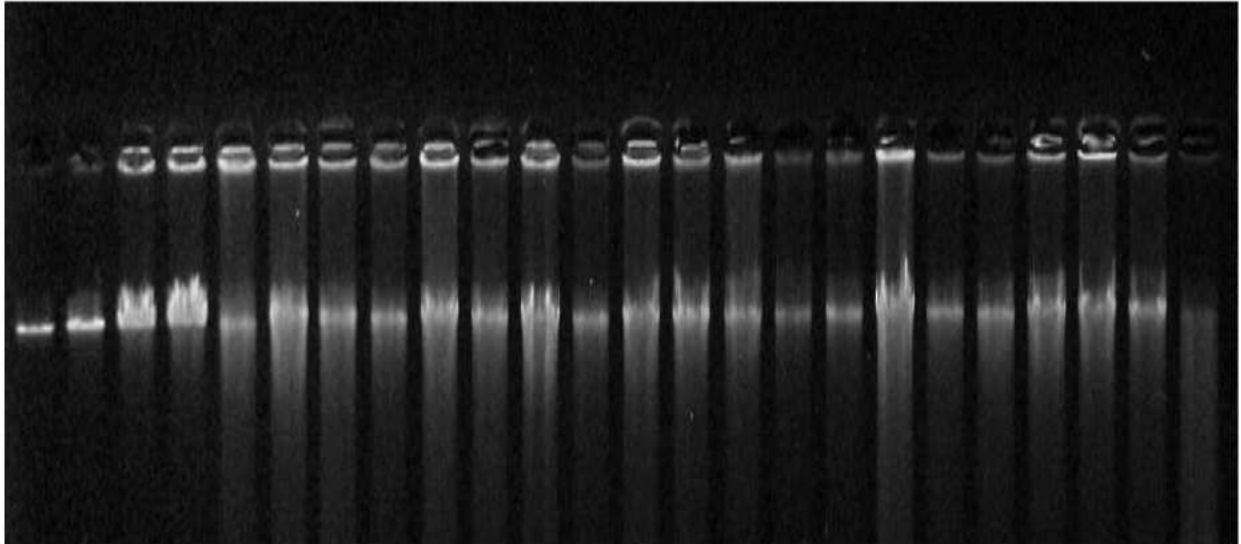


Figura 1. Gel de quantificação do DNA genômico total. Respetivamente, 20, 50, 100, 200 e os indivíduos de *A. aculeatum*

Após a otimização das condições de PCR para a amplificação das regiões de cpDNA (Tabela 1), foram amplificados 20, dos 100 pares de *primers* de cpDNA desenvolvidos por Scarcelli *et al.* (2011) utilizando-se inicialmente a amostra 'Sol 9' (Figura 2). Dos 20 pares de *primers* utilizados, confirmou-se a transferabilidade de 18 marcadores para *A. aculeatum*.

Tabela1. Condições de amplificação dos primers, em que: LSC – região de cópia única grande; SSC – região de cópia única pequena; IR – região repetida invertida; Exon – região codificadora; Intron e IGS – regiões não-codificadoras.

Identificação	Nome	T°C	Localização	Tipo
Scl 1	trnK-rps16	62°	LSC	IGS
Scl 2	rps16-trnQ	64°	LSC	IGS
Scl 3	trnQ-psbK	60°	LSC	IGS
Scl 4	psbK-trnS	62°	LSC	IGS+Gene
Scl 5	trnG Intron	62°	LSC	Intron
Scl 6	atpF-atpH	62°	LSC	IGS
Scl 7	rpoB-trnC	58°	LSC	IGS
Scl 8	trnT-psbD	60°	LSC	IGS
Scl 9	psbZ-trnfM	53°	LSC	IGS+Gene
Scl 10	trnL Intron	62°	LSC	Intron
Scl 11	trnL-ndhJ	58°	LSC	IGS+Gene
Scl 12	rbcL-accD	58°	LSC	IGS
Scl 13	petD-rpoA	58°	LSC	IGS
Scl 14	rpl16-rps3	62°	LSC	IGS
Scl 15	rrnn4.5-trnN	62°	IR	IGS+Gene
Scl 16	rps15-ycf1	62°	SSC	IGS
Scl 17	ndhA Intron	58°	SSC	Intron+Exon
Scl 18	ndhH Exon	56°	SSC	Exon
Scl 19	ndhG-ndhI	58°	SSC	IGS
Scl 20	ccsA Exon	53°	SSC	Exon

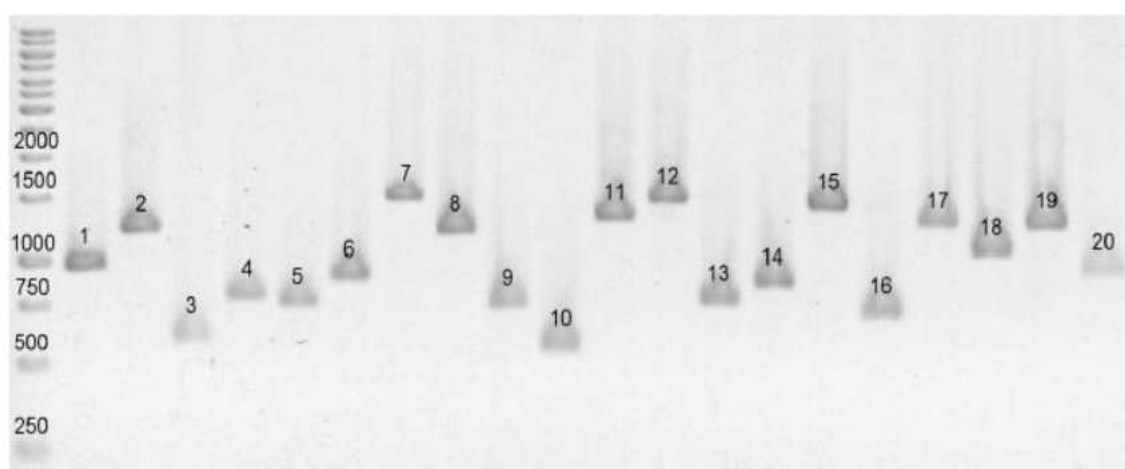


Figura 2. Gel de amplificação do 20 pares de primers utilizados na amostra 'Scl 9'. Marcador: 1 Kb DNA Ladder.

O sequenciamento dos produtos de PCR forneceram sequências nucleotídicas finais com boas condições de alinhamento para a maioria dos marcadores. Obtiveram destaque as regiões de amplificação em *trnK-rps16* (Scl 1), *atpF-atpH* (Scl 6), *petD-rpoA* (Scl 13), *rps15-ycf1* (Scl16) e *ndhA Intron* (Scl 17), que apresentaram maior quantidade de substituições, inserções e deleções em suas sequências (Tabela 2).

Tabela 2. Primers que apresentaram quantidades mais significativas de polimorfismo, com o número de pares de base e mutações.

Identificação	Nome	Pares de bases	Mutações
Scl 1	<i>trnK-rps16</i>	483	3
Scl 6	<i>atpF-atpH</i>	624	4
Scl 13	<i>petD-rpoA</i>	509	4
Scl 16	<i>rps15-ycf1</i>	422	5
Scl 17	<i>ndhA Intron</i>	364	7

## 5. CONCLUSÃO

Das 18 sequências de regiões cpDNA, cinco apresentaram -se variáveis quanto a presença de deleções, adições e substituições de base, das quais serão selecionadas duas mais variáveis para análises de dez indivíduos.

O projeto atingiu seus objetivos, no entanto, a obtenção de sequências com qualidade para o alinhamento avançou o cronograma, o que alterou o cronograma, não permitindo o cumprimento de uma das metas de caracterização dos dados testados a partir dos 20 regiões de cpDNA, o que será concluído para apresentação final.

## 6. REFERÊNCIAS

Avise, J.C. 1998. History and pureview of phylogeography. *Molecular Ecology*, 7: 371-379.

Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 2000, 447p.

Buckley, D.P.; O'Malley, D.M.; Apsit, V.; Prance, G.T.; Bawa, K.S. 1988. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). 1. Genetic variation in natural populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 76: 923-928.

Cavalcante, P. B. *Frutas comestíveis da Amazônia*. 5ta ed. Belém: CEJUP, CNPq, Museu Paraense Emilio Goeldi, 1991, 279p.

Clement, C.R.; Lleras Pérez, E.; van Leeuwen, J. 2005. O potencial das palmeiras tropicais do Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. *Agrociencias*. Montevideu, 9 (1-2): 67-71.

Costa, J.R.; van Leeuwen, J.; Costa, J.A. 2005. Tucumã-do-amazonas (*Astrocaryum tucuma*). In: Shanley, P.; Medina, G. (Ed.). *Frutíferas e Plantas Úteis na Vida da Amazônia*. CIFOR, Imazon, Belém, Pará, p.215-222.

Demesure, B.; Comps, B.; Petit, R.J. 1996. Chloroplast DNA phylogeography of the common beech *Fagus sylvatica* L. in Europe. *Evolution*, 50(6): 2515-2520.

Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.

Dutech, C.; Maggia, L.; Tardy, C.; Joly, H.I.; Jarne, P. 2003. Tracking a genetic signal of extinction-recolonization events in a neotropical tree species: *Vouacapoua americana* Aublet in French Guiana. *Evolution*, 57(12): 2753-2764

Ehrlich, P.R.; Raven, P.H. 1969. Differentiation of populations. *Science* 165: 1228-1232.

Ennos R.A. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity*, 72: 250-259.

Ennos, R.A.; Sinclair, W.T.; Hu, X.-S.; Langdon, A. 1999 Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. In: Hollingsworth, P.M.; Bateman, R.M.; Gornall, R. J. (Ed). *Molecular Systematics and Plant Evolution*. The Systematics Association Special Volume Series. p.1-19.

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

Excoffier, L.; Somouse, P.E.; Quattro, J.M. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics Society of America*, 131: 479-491.

Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220 p.

Ferreira, M.E.; Moretzsohn, M.C.; Buso, G.S.C. 2007. Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: Nass, L.L. (Ed.). *Recursos genéticos vegetais*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal, p.377-420.

Harris, S.A.; Ingram, R. 1991. Chloroplast DNA and biosystematics: The effects of intraspecific diversity and plastid transmission. *Taxon*, 40: 393-412.

Henderson, A.; Galeano, G.; Bernal, R. 1995. Field guide to the palms of the americas. New Jersey: Princeton University Press.



Hewitt, G.M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58: 247-276.

Hong, Y.P.; Hipkins, V.D.; Strauss, S.H. 1993. Chloroplast DNA diversity among trees, populations and species in the California closed-cone pines (*Pinus radiata*, *Pinus muricata* and *Pinus attenuata*). *Genetics*, 135: 1187-1196.

Kahn F. & B. Millán. 1992. *Astrocaryum* (Palmae) in Amazonia. A preliminary treatment. *Bull. Inst. fr. Ét. and.*, 21 (2): 459–531.

Kahn, F.; Moussa, F. 1999. Economic importance of *Astrocaryum aculeatum* (Palmae) in Central Brazilian Amazonia. *Acta Botanica Venezuelica*, 22: 237-245.

Lopes, M.T.G.; Macêdo, J.L.V.; Lopes, R.; Van Leeuwen, J.; Ramos, S.L.F.; Bernardes, L.G. 2009. Domesticação e melhoramento do Tucumã-do-amazonas. In: Borém, A.; Lopes, M.T.G.; Clement, C.R. (Ed.). *Domesticação e melhoramento de plantas – espécies amazônicas*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

Mayer, M. S.; Soltis, P.S. 1994. The evolution of serpentine endemics: a cpDNA phylogeny of *Streptanthus glandulosus* complex (Cruciferae). *Systematic Botany* 19: 557–574.

McCauley, D.E. 1994. Contrasting the distribution of chloroplast DNA and allozyme polymorphism among local populations of *Silene alba*: implications for studies of gene flow in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 8127-8131.

Mendonça, M.S.; Araújo, M.G.P. de. 1999. A semente de Bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart. – Arecaceae): Aspectos morfológicos. *Revista Brasileira de Sementes*, 21(1): 122-124.

Miranda, I.P.A.; Rabelo, A.; Bueno, C.R.; Barbosa, E. M.; Ribeiro, M.N.S. 2001. Frutos de palmeiras da Amazônia. MCT INPA, Manaus.

Nass, L.L. 2001. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: Nass, L.L.; Valois, A.C.C.; Melo, I.S.; Valadares-Inglis, M.C. (Ed.). *Recursos genéticos & melhoramento - plantas*. Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso, Rondonópolis, Mato Grosso, p.29-56.

Novick, R.R.; Dick, C.W.; Lemes, M.R.; Navarro, C.; Caccone, A; Bermingham, E. 2003. Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, 12: 2885-2893.

Olsen, K.M.; Schaal, B.A. 1999. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 5586-5591.

Olsen, K.M. 2002. Population history of *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) inferred from nuclear DNA sequences. *Molecular Ecology*, 11: 901-911.

Provan, J.; Soranzo, N.; Wilson, N. J.; McNicol, J.W.; Morgante, M.; Powell, W. 1999. The use of uniparentally inherited simple sequence repeat markers in plant population studies and systematics. In: Hollingsworth, P.M.; Bateman, R.M.; Gornall, R.J. (Ed). *Molecular Systematics and Plant Evolution*. The Systematics Association Special Volume Series. p. 35-50.

Provan, J.; Powell, W.; Hollingsworth, P. M. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 16: 142-147.

Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.

Ritland, K. 1983. Estimation of mating systems. In: Tanksley, D.; Orton, T.J. (Ed.). *Isozymes in plant breeding and genetics - part A*. Elsevier, Amsterdam. p. 289-302.

Rozas, J.; Sánchez-Delbarrio, J.C.; Messenguer, X.; Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496-2497.

Scarcelli, N.; Berbaud, A.; Eiserhardt, W.; Treier, U.A.; Seveno, M.; D'Anfray, A.; Vigouroux, Y.; Pintaud, J.C. 2011. A Set of 100 Chloroplast DNA Primer Pairs to Study Population Genetics and Phylogeny in Monocotyledons. *Plos One*, 6: 1-8.

Schaal, B.A.; Hayworth, D.A.; Olsen, K.M.; Rauscher, J.T.; Smith, W.A. 1998. Phylogeographic studies in plants: Problems and prospects. *Molecular ecology*, 7: 465-474.

Schroth, G.; Mota, M.S.S.; Lopes, R.; Freitas, A.F. 2004. Extractive use, management and in situ domestication of a weedy palm, *Astrocaryum tucuma*, in the Central Amazon. *Forest Ecology and Management*, 202: 161-179.

Souza, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: Nass, L.L.; Valois, A.C.C.; Melo, I.S.; Valadares-Inglis, M.C. (Ed.). *Recursos genéticos & melhoramento - plantas*. Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso, Rondonópolis, Mato Grosso, p.231-280.

Terauchi, R.; Terachi, T.; Tsunewaki, K. 1991. Intraspecific variation of chloroplast DNA in *Dioscorea bulbifera* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 81: 461-470.

Vencovsky, R.; Nass, L.L.; Cordeiro, C.M.T.; Ferreira, M.A.J.F. 2007. Amostragem em recursos genéticos vegetais. In: Nass, L.L. (Ed.). *Recursos genéticos vegetais*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal, p.231-280.

Walter, B.M.T.; Cavalcanti, T.B.; Bianchetti, L.B. 2007. Principios sobre coleta de germoplasma vegetal. In: Nass, L.L. (Ed.). *Recursos genéticos vegetais*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal, p.193-229.

Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acid Research*, 18: 6531-6535.

