

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
EVOLUÇÃO

“ANÁLISE MOLECULAR E VALIDAÇÃO DE RAÇAS
PRIMITIVAS DE PUPUNHA (*Bactris gasipaes*) POR MEIO
DE MARCADORES RAPD”

CIRLANDE CABRAL DA SILVA

São Carlos – SP
2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
EVOLUÇÃO

“ANÁLISE MOLECULAR E VALIDAÇÃO DE RAÇAS
PRIMITIVAS DE PUPUNHA (*Bactris gasipaes*) POR MEIO
DE MARCADORES RAPD”

CIRLANDE CABRAL DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução.

São Carlos – SP
2004

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S586am

Silva, Cirlande Cabral da.

Análise molecular e validação de raças primitivas de pupunha (*Bactris gasipeaes*) por meio de marcadores RAPD / Cirlande Cabral da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2006.
68 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Genética molecular. 2. Pupunheira. 3. RAPD. I. Título.

CDD: 574.87328 (20^a)

Trabalho realizado nos Laboratórios de Genética e Cultura de Tecido Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Amazonas sob a orientação do Dr. Spartaco Astolfi Filho e do Dr. Charles Roland Clement.

A minha mãe Iracema Cabral da Silva, pelas angústias e preocupações que demonstrou por minha causa, por ter dedicado sua vida a mim, pelo amor, estímulo e carinho que me ofereceu e principalmente por ter abdicado seus sonhos em função dos meus!

Dedico

“Todos os desejos sinceros do coração são realizados”

K. Gibran

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a *DEUS que é fonte de inspiração e sabedoria...*

Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho, por ter sido mais que um orientador, um amigo, e por ter me oferecido a oportunidade para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Charles Roland Clement, pela orientação, paciência, e incentivo para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao Prof. Dr. José Odair Pereira, pelo apoio, confiança e amizade que sempre demonstrou para comigo.

À Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pela acolhida e oportunidade na realização deste trabalho.

Ao Banco da Amazônia, S.A. e à Fundação Djalma Batista pelo apoio financeiro recebido via o projeto “Marcadores moleculares (RAPDs) na discriminação das raças primitivas de pupunha (*Bactris gasipaes*) mantidas no Banco Ativo de Germoplasma”, coordenado pelo Dr. Charles R. Clement.

Aos funcionários e alunos do Laboratório de Cultura de Tecido Vegetal (UFAM), pela ajuda, carinho e amizade durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Banco Ativo de Germoplasma de Pupunha do INPA (Estação Experimental de Fruticultura Tropical, KM 41 BR 174) pela ajuda na etapa de coleta de material.

A Doriane P. Rodrigues, a quem, sem dúvida nenhuma, devo muito mais que um simples muito obrigado.

Ao meu amigo, Max Ferreira, que sempre esteve presente durante a realização desse trabalho.

A minha amiga e professora, Elcy Barbosa da Silva, que sempre foi e será meu referencial.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Marcadores moleculares foram utilizados para verificar a variabilidade genética de oito raças primitivas de pupunha (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes*) e duas populações silvestres (*B. gasipaes* var. *chichagui*), suas relações e estruturas genéticas. Foram utilizadas 200 plantas das 8 raças primitivas de pupunha e 18 plantas de duas populações silvestres, sendo uma do rio Magdalena, Colômbia, e outra do rio Xingu, Pará, Brasil. Oito iniciadores foram usados para gerar marcadores RAPD, obtendo 124 marcadores, dos quais 101 polimórficos. A heterozigosidade observada do conjunto de raças e populações foi de 0,38, com porcentagem de polimorfismo de 93%, ambas um pouco maior que nos estudos anteriores. As raças da Amazônia apresentaram maiores heterozigosidades e % polimorfismo que a raça de América Central. A estrutura do dendrograma baseado nas distâncias de Nei (1972) para as quatro raças estudadas anteriormente foi muito similar a este primeiro estudo, essencialmente validando esta, e confirmando dois grupos de raças – um Ocidental e um Oriental. Quando a raça Juruá foi adicionada à análise, se agrupou com as raças Ocidentais, como esperado pelo posicionamento geográfico. Quando as outras raças (com tamanhos amostrais insuficientes) foram adicionadas à análise, observou-se algumas consistências e problemas. A consistência principal foi o agrupamento de todas as raças ocidentais no lado ocidental do dendrograma. Os problemas foram os agrupamentos da raça Vaupés com a raça Juruá, que são distantes geograficamente e possuem formatos e tamanhos de fruto muito diferentes. A

relação entre Cauca e Inirida também foi problemática, pois são geograficamente separadas. Estes problemas somente podem ser resolvidos com novas coletas de germoplasma nas áreas geográficas apropriadas com um número apropriado de indivíduos. As duas populações silvestres se agruparam muito longe das raças, sugerindo que não participaram da domesticação das populações cultivadas e indiretamente reforçando a hipótese de uma origem no sudoeste da Amazônia.

ABSTRACT

Molecular markers were used to examine the genetic variability of eight landraces of peach palm (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes*) and two wild populations (*B. gasipaes* var. *chichagui*), their relationships and genetic structures. Two hundred plants of these 8 races were used and 18 plants of the two wild populations, one from the Magdalena River, Colômbia, and the other from the Xingu River, Pará, Brasil. Eight primers were used to generate RAPD markers, of which 124 markers were obtained with 101 polymorphic. The observed heterozygosity of the set of landraces and wild populations was 0.38, with 93 % polymorphism, both slightly greater than in earlier studies. The Amazonian landraces had greater heterozygosity and % polymorphism than the Central American race. The structure of the dendrogram based on Nei's (1972) distances with the four previously studied landraces was similar to that study, essentially validating it and confirming two landrace groups – one Occidental and one Oriental. When the Juruá landrace was added to the analysis, it joined with the other Occidental races, as expected by its geographic position. When the other landraces (with small sample sizes) were added to the analysis, a consistency and some problems were observed. The consistency was that all the landraces joined the Occidental group, expected by their geographic positions. The problems were the grouping of the Vaupés landrace with the Juruá landrace, which are geographically distant and have different fruit sizes and shapes. The relationship between the Cauca landrace and the Inirida landrace was also

problematic, since they are geographically separated. These problems can only be resolved with new germplasm collections in the appropriate geographic areas and with an appropriate number of individuals. The two wild populations joined the landraces at a great distance, suggesting that they did not participate in the domestication of the cultivated landraces and indirectly reinforcing the hypothesis of a single origin in southwestern Amazonia.

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 – Raças de pupunha cultivada das classes “microcarpa”, “mesocarpa” e “macrocarpa” dos grupos Oriental e Ocidental (Mora Urpí, 1993, com modificação).	17
Tabela 2 – Iniciadores utilizados na análise e suas respectivas sequências de bases.	42
Tabela 3 – Número de marcadores úteis obtidos de cada iniciador nas 8 raças de pupunha cultivada (<i>B. gasipaes</i> var. <i>gasipaes</i>), duas populações de pupunha silvestre (<i>B. gasipaes</i> var. <i>chichagui</i>), e número de marcadores polimórficos para cada raça ou população.	45
Tabela 4 – Heterozigosidade e % de loci polimórficos (95% e 99%) das 8 raças de pupunha cultivada (<i>B. gasipaes</i> var. <i>gasipaes</i>), duas populações de pupunha silvestre (<i>B. gasipaes</i> var. <i>chichagui</i>) e em geral.	47

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 – Distribuição de <i>B. gasipaes</i> var. <i>gasipaes</i> (sombra leve) e suas raças ocidentais (mesocarpa – 1. Rama, 2. Guatuso, 3. Utilis, 4. Tuíra, 5. Cauca) e amazônicas (microcarpa – 6. Tembé, 7. Juruá, 8. Pará; mesocarpa – 9. Solimões, 10. P. Hermosa, 11. Tigre, 12. Pastaza, 13. Inirida; macrocarpa – 14. Putumayo, 15. Vaupés).	15
Figura 2 – Base genética de marcadores moleculares RAPD (Ferreira & Grattapaglia, 1988).	34
Figura 3 – Dendrograma baseado nas Distâncias de Nei (1972) entre as três raças da Amazônia e uma da América central de pupunha cultivada (<i>Bactris gasipaes</i> var. <i>gasipaes</i>) que valida a metodologia. A consistência dos nós é dada em porcentagem dos marcadores que os apóiam.	49
Figura 4 – Dendrograma baseado nas Distâncias de Nei (1972) com as três raças da Amazônia e uma da América central, com a inclusão da raça Juruá de pupunha cultivada (<i>B.gasipaes</i> var. <i>gasipaes</i>). A consistência dos nós é dada em porcentagem dos marcadores que os apóiam.	50
Figura 5 – Dendrograma baseado nas Distâncias de Nei (1972) com as 8 raças de pupunha cultivada (<i>B.gasipaes</i> var. <i>gasipaes</i>) e as duas populações silvestres (<i>B.gasipaes</i> var. <i>chichagui</i>) usadas como “out groups”. A consistência dos nós é dada em porcentagem dos marcadores que os apóiam.	51

LISTA DE APÊNDICES

	Pág.
Apêndice 1 – Identificação das 200 amostras de pupunha mantidas no Banco Ativo de Germoplasma de Pupunha do INPA e utilizadas nas análises RAPD.	62
Apêndice 2 – Perfil eletroforético obtido com o iniciador OPA-4 a partir do DNA de oito raças de pupunha. (M= 1KB Ladder [Gibco]; C=controle; pb = pares de bases).	68

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	6
2. 1. Descrição Botânica.....	6
2. 2. Taxonomia.....	8
2. 3. Diversidade Genética e origem da pupunha.....	10
2.4. Domesticação e raças.....	18
2. 5. Disponibilidade de recursos genéticos.....	21
2. 6. Pesquisas realizadas com recursos genéticos.....	22
2. 7. Uso de marcadores moleculares em pupunha.....	24
2. 7.1. A técnica RAPD.....	30
2.7-2. Base genética dos marcadores RAPD.....	33
2.8. Métodos estatísticos utilizados na análise genética.....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3. 1. Extração e amplificação de DNA, e eletroforese.....	41
3.2. Análise genética e estatística dos dados.....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4. 1. Reprodutibilidade da reação RAPD.....	44
4. 2. Análise genética das raças.....	44
5. CONCLUSÕES	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

Os primeiros povos europeus já se referiam à importância da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth, Palmae) e à sua utilização, que aprenderam com os índios. Acredita-se que sua domesticação começou devido ao interesse por sua madeira, usada para fabricação de instrumentos de caça e de guerra devido sua flexibilidade e dureza (Patiño, 1989). Os Europeus observavam também que outras partes dessa planta poderiam ser aproveitadas: a raiz como vermicida, o tronco como madeira para a construção de casas e fortificações (Patiño, 1989). As flores masculinas serviam como tempero depois de caírem e seu palmito era consumido ocasionalmente (Clement, 2000). Os frutos das populações silvestres, ricos em óleos, oferecem uma importante fonte de energia, o que poderia ter incentivado sua domesticação como fruteira (Clement *et al.*, 1989).

A pupunha ocupou um lugar de destaque na economia indígena antes da conquista das Américas. Acredita-se que foi tão importante quanto a mandioca (*Manihot sculenta*) e o milho (*Zea mays*) em algumas partes de sua distribuição pré-colombiana (Clement, 1988). Esta era uma palmeira tão importante para os ameríndios que eles saudavam com grandes festas o período de fartura que chegava com cada safra. Ainda hoje, os índios que habitam a região de rio Vaupés, na fronteira com a Colômbia, mantêm esses festejos tradicionais, durante os quais, entre cantos e danças, o fruto é cozido e uma bebida feita de pupunha fermentada,

ambos sendo consumidos em quantidade. A pupunha ainda mantém alguma importância na subsistência das populações tradicionais da Amazônia, embora raramente chegue a uma produção suficiente para registros oficiais.

Nos estudos realizados sobre pupunha verificou-se que esta possui uma ampla diversidade morfológica e genética em suas populações silvestres e cultivadas, devido apresentarem diferentes graus de domesticação. Algumas destas já foram parcialmente caracterizadas morfológicamente e mapeadas (Mora Urpí, 1984; Mora Urpí & Clement, 1988; Clement, 1988; Mora Urpí, 1992; Clement, 1995). Raças primitivas de pupunha apresentam características químicas e produtivas que permitem que estas possam ser usadas como bases genéticas em programas de melhoramento genético (Clement & Mora Urpí, 1987). Desta forma é interessante verificar se as relações morfométricas estão de acordo com as relações genéticas, o que servirá de suporte para qualquer programa de melhoramento dessa espécie.

Clement & Mora Urpí (1987) discutiram cinco usos atuais e potenciais da pupunha: (1) fruto para consumo humano direto, (2) farinha para panificação, (3) farinha para ração animal, (4) óleo vegetal, e (5) palmito. A demanda principal hoje é para o palmito de pupunha, pois está se tornando um agronegócio rentável (Bovi, 1997). Atualmente há 28.000 ha de área plantada somente no Estado de São Paulo e sua área continua expandindo-se rapidamente (Marilene L. A. Bovi, IAC, com. pess. a Charles R. Clement, 2004). O potencial da pupunha pode ser mais bem

aproveitado se for melhorada para fins específicos, pois a diversidade genética presente nessa espécie permite selecioná-la para qualquer um dos potenciais descritos acima.

O Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) mantém um Banco Ativo de Germoplasma de Pupunha, em colaboração com a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, que possui 438 acessos, coletados de populações silvestres e cultivadas com o objetivo de disponibilizar genótipos superiores ao processo de melhoramento dessa espécie (Clement, 1996). A caracterização e avaliação de populações, tanto fenotípica, como genotipicamente, é importante para conhecer sua estrutura genética e avaliar aquelas características que estejam ligadas ao processo produtivo (Frankel, 1989). Em qualquer trabalho feito com recursos genéticos, seja para conservação ou melhoramento, a caracterização morfométrica e a avaliação produtiva das coleções são as bases para os outros estudos. As características descritas no campo durante a coleta (*in situ*) podem ser altamente afetadas por fatores ambientais e podem apresentar maior variabilidade aparente entre e dentro as populações do que realmente existe. Por outro lado, a caracterização feita no banco de germoplasma mede mais claramente as diferenças genéticas entre as populações (Frankel, 1989).

Nos últimos anos, numerosas investigações têm sido feitas para se avaliar a estrutura da variabilidade genética de populações usando as diversas técnicas de marcadores moleculares. Atualmente o seu uso é uma ferramenta

complementar para caracterizar germoplasma (Ferreira & Grattapaglia, 1998), tanto para oferecer marcadores que podem apoiar a seleção (Stuber, 1992), como para a identificação de raças primitivas (Doebley, 1990). Na pupunha, a primeira experiência com técnicas moleculares foi com isoenzimas, ferramenta considerada eficiente para o exame da variação genética porque exibem herdabilidade mendeliana, expressão co-dominante, e a ausência de expressões pleitrópicas e epistáticas (Weeden & Wendel, 1989). As isoenzimas são usadas para caracterizar e identificar cultivares, documentar a paternidade de cultivares ou híbridos interespecíficos, e examinar as relações genéticas entre acessos e coleções de germoplasma (Torres, 1989). Podem servir como marcadores para caracteres quantitativos, como o crescimento e a produtividade (Stuber, 1991).

Além de isoenzimas, a análise direta do DNA tem grande potencial em pupunha, embora os custos sejam mais altos e a necessidade de treinamento é muito maior (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Uma das primeiras técnicas moleculares usadas com a pupunha foi a dos RAPDs (Picanço *et al.*, 1999), cujas limitações principais são a replicabilidade e a interpretação genética da variação que vai além de uma pura descrição fenotípica do genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Apesar da caracterização molecular não substituir a análise morfométrica, ajuda-nos a entender melhor a variabilidade genética das raças e populações. Por esse motivo, estas técnicas têm sido utilizadas em coleções de germoplasma, onde a quantidade de marcadores convencionais é reduzida e o custo

de manutenção elevado, identificando indivíduos que assegurem uma base genética ampla e descartando os que estiverem em duplicata. Os marcadores moleculares permitem gerar uma grande quantidade de informações sobre a diversidade genética e relações filogenéticas no germoplasma utilizado pelo melhorista.

Diante do considerável potencial dos marcadores moleculares no estudo da variabilidade genética existente entre raças e populações, os objetivos desse trabalho foram: (1) Caracterizar e avaliar a variabilidade genética de uma amostra das raças primitivas mantidas no Banco Ativo de Germoplasma de Pupunha do INPA com a técnica molecular RAPD; (2) Validar as conclusões sobre as raças Pampa Hermosa, Putumayo, Pará e Útilis dentro do conjunto maior de raças; e (3) Analisar as relações genéticas entre as raças primitivas Juruá, Inirida, Vaupés e Cauca.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Descrição Botânica

A pupunha (*Bactris gasipaes*) é uma palmeira cespitosa (multicaule) que pode atingir 20 m de altura. O sistema radicular é fasciculado como em outras monocotiledôneas, estendendo-se até 7 m do estipe e a 2 m de profundidade. O diâmetro do caule varia de 15 a 30 cm e o comprimento dos entrenós de 1 a 30 cm. O ápice do estipe sustenta uma coroa de 15 a 25 folhas pinadas, com os folíolos inseridos em diferentes ângulos. As folhas tenras não expandidas, localizadas no centro da coroa, formam o palmito. Após a polinização, os cachos podem conter de 50 a 1000 frutos e pesar de 1 a 25 kg. Diversos fatores, tais como nutrição ou polinização deficiente, estiagem, competição e ataque de pragas e doenças, podem causar o aborto dos frutos e contribuir para o baixo peso médio do cacho. O fruto individual pesa entre 10 e 250 g e, tradicionalmente, é o principal produto econômico. Quando maduro, este possui um epicarpo fibroso que varia de cor, podendo ser vermelha, laranja ou amarela, e um mesocarpo que varia de amiláceo a oleoso, com um endocarpo envolvendo uma amêndoa (semente) fibrosa e oleosa.

Devido à diferença entre a antese masculina e feminina numa mesma inflorescência a pupunha é predominantemente alógama (Mora Urpí *et al.*, 1997). Segundo Mora Urpí & Solis (1980), existem três mecanismos de polinização na

pupunha: o primeiro efetuado por Curculionidae pertencente aos gêneros *Derolemus* e *Phylotrox*, o segundo pelo vento e o terceiro pela gravidade. Este último mecanismo está limitado pelo sistema genético de incompatibilidade, favorecendo desta maneira a exogamia.

As pupunheiras silvestres são encontradas nas matas úmidas, distribuídas em baixa densidade, sob um regime de chuvas igual ou superior a 1.500 mm/ano e a uma temperatura média acima de 24° C. As pupunheiras cultivadas se desenvolvem melhor em solos férteis, ligeiramente argilosos e a uma precipitação superior a 2.000 mm, com boa drenagem, porém podem crescer em clima seco com sistema de irrigação por aspersão e com temperatura média de 24° C ou superior (Mora Urpí, 1992).

A floração e a frutificação da pupunha são sazonais, com a floração principal ocorrendo no final da estação da estiagem na Amazônia - entre setembro e novembro em Manaus, AM. O desenvolvimento do fruto leva em torno de 60 a 90 dias na Amazônia Central (Ferreira, 1996), geralmente começando a aparecer no mercado no final de novembro e estendendo-se até o início de março. Em anos de safra pequena, ou de clima excepcionalmente favorável, poderá haver uma segunda safra, cuja floração ocorre na segunda metade da estação chuvosa (abril-junho), com a frutificação em meados da estação de estiagem (julho-agosto). O lançamento foliar ocorre regularmente ao longo do ano, embora a expansão das folhas possa atrasar-se

durante estiagens acentuadas, quando 2, 3, até 4 folhas guias se acumulam na coroa até o fim da estiagem.

2.2. Taxonomia

A pupunha tem recebido diversos nomes científicos desde sua descrição original, em 1816. A revisão mais recente do gênero *Bactris* reduziu o velho táxon *Guilielma*, que chegou a conter 13 nomes, para um: *Bactris gasipaes* Kunth. Este novo conceito contém duas variedades: *B. gasipaes* var. *gasipaes*, que inclui todas as populações domesticadas de pupunha; e *B. gasipaes* var. *chichagui*, que inclui todas as populações silvestres de pupunha, uma ou mais das quais deram origem às populações domesticadas (Henderson, 2001). Esse novo conceito traz vantagens e desvantagens. Entre as vantagens, está o fato de que mostra claramente a relação entre as populações silvestres e as domesticadas, o que não era claro antes. Entre as desvantagens, existe o fato de que três grupos de populações silvestres, com características morfológicas e ecológicas distintas e distribuições disjuntas, estão incluídas na mesma variedade.

O conceito de *B. gasipaes* var. *chichagui* de Henderson apresenta uma distribuição disjunta (Henderson, 2001). No norte, o táxon é distribuído ao longo dos dois lados dos Andes e nos vales interandinos na Colômbia e Venezuela até 600 m a.n.m.; originalmente incluiu dois táxons: *B. macana* e *B. caribaea* (agora

sinônimos). No sul, o táxon é distribuído no sudoeste da Amazônia ao longo dos Andes (até 1000 m a.n.m.) e na hiléia ao sul do rio Solimões e ao oeste da bacia do rio Tapajós. Originalmente incluiu pelo menos os táxons *B. ciliata* e *B. dahlgreniana*. A distribuição na hiléia sugere importantes diferenças na adaptação ecológica de *B. dahlgreniana* comparada com *B. macana* no norte, o que sugere uma história de isolamento genético entre as populações do norte e do sul que provavelmente possui uma duração de diversos milhões de anos. *B. dahlgreniana* Glassman, a pupunha brava, considerada por Henderson (2001) como sinônimo de *B. gasipaes* var. *chichagui*, é um possível progenitor da pupunha no sudoeste da Amazônia (Clement et al., 1989).

A distribuição da *B. gasipaes* var. *chichagui* no sudoeste da Amazônia é extensa e existe variação morfológica principalmente da parte reprodutiva. É interessante notar que os frutos deste táxon na região de Rio Branco, Acre, são muito menores em relação àqueles encontrados ao longo do rio Ucayali (Clement et al., 1989). Clement et al. (1989) relataram que três análises discriminantes, comparando a *B. dahlgreniana* e a pupunha cultivada, demonstraram que as espécies são vegetativamente similares e reprodutivamente distintas, com tendências que sugerem que a primeira é progenitora da segunda.

Clement et al. (1999) relataram que duas populações simpátricas deste táxon (denominadas tipo Acre e Ucayali) foram encontradas nos municípios de Benjamin Constant, Amazonas, Brasil, a 600 km ao noroeste da Boca do Acre,

Amazonas, e 300 km a leste do baixo rio Ucayali, Loreto, Peru, áreas de ocorrência na descrição original do táxon. Estas populações ocorrem em florestas primárias e nas roças das comunidades locais, nunca são plantadas, mas são toleradas quando ocorrem espontaneamente.

Duas populações silvestres, uma do rio Magdalena (var. *chichagui* ex-*B. macana*) e outra do rio Xingu (var. *chichagui* ex-*B. Dahlgreniana*), foram utilizadas como “out groups” neste estudo. Embora o número de plantas de cada população não foi suficiente para tirar conclusões firmes, a inclusão destas populações oferecerá informações úteis para elaborar novas hipóteses sobre as relações filogenéticas dentro da espécie.

2.3. Diversidade Genética e origem da Pupunha

Em qualquer espécie existem diferenças entre indivíduos, causadas pela sua constituição genética (os genes e seus alelos, que formam o genótipo) e pela influência do ambiente na expressão do genótipo, originando o fenótipo (o indivíduo). O conjunto das diferenças genéticas entre os indivíduos de uma espécie é conhecido como a diversidade genética dessa espécie. Em geral, quanto maior for a distribuição geográfica e a adaptação a diferentes ambientes dentro dessa distribuição, maior será a diversidade genética dessa espécie.

Conforme o homem primitivo usava, cultivava e domesticava uma determinada espécie, a diversidade genética dessa espécie ia pouco a pouco se expandindo graças aos seguintes fatores: (1) seleção dos indivíduos (alelos) que mais lhe interessavam, com a redução gradual da abundância dos outros, porém sem sua eliminação, e a seleção de mutações esteticamente interessantes ou que permitiram identificar os genótipos preferidos; (2) migração, junto com a tribo, de pequenas amostras (alelos) que tiveram de se adaptar ao novo ambiente e mostrar novas expressões fenotípicas dos alelos; (3) hibridação natural com outras populações da mesma espécie ou de espécies afins (resultando em novas combinações de alelos/genes), decorrentes da migração. Esses processos poderiam atuar em qualquer sequência ou em conjunto para aumentar a diversidade.

A origem da pupunha permanece uma incógnita após mais de 100 anos de especulação, com duas hipóteses dominando as discussões atuais. A primeira sugere que a pupunha foi domesticada uma vez em algum lugar no sudoeste da Amazônia perto dos Andes (Clement 1995, Huber 1904, Prance 1984, Seibert 1950), enquanto a segunda sugere que foi domesticada várias vezes em vários lugares da distribuição da variedade *chichagui* (Mora Urpí 1992, 1993). A evidência que permitirá confirmar uma dessas hipóteses deverá incluir a distribuição da variabilidade morfológica, química e genética dos táxons da variedade *chichagui* e sua relação com a variabilidade das raças primitivas criadas pelos povos indígenas da América tropical.

Em uma viagem ao rio Ucayali, no Peru, J. Huber (1904) encontrou no meio da floresta uma palmeira semelhante, mas não idêntica, à pupunha. Concluiu-se tratar de uma espécie aparentada com a pupunha cultivada. Ele a descreveu como *Guilielma microcarpa* Huber (subseqüentemente transformada em *Bactris dahlgreniana* Glassman [1972] e agora sinônimo de var. *chichagui*), e lançou a hipótese de que esta poderia ser uma progenitora da pupunha, até então considerada um “cultígeno”, ou seja, uma espécie domesticada sem progenitores aparentes na flora nativa. Huber ainda supôs que a pupunha poderia ser de origem híbrida e que a *B. dahlgreniana* poderia ser um dos progenitores e *B. insignis* Martius, o outro.

Em 1979, Mora Urpí concordou com Huber sobre a provável origem híbrida da palmeira. Ele sugeriu, no entanto, que a hibridização não deve ter ocorrido num só tempo e lugar, mas poderia ter ocorrido entre mais de duas populações progenitoras (Mora Urpí, 1984). Segundo este autor, a domesticação ocorreu independentemente em várias localidades ao longo do território do táxon *Guilielma* a partir de populações silvestres geneticamente diferentes. Mora Urpí (1993) listou três hipóteses sobre a origem da pupunha: (1) originou-se em um centro andino de plantas cultivadas, descrito por Vavilov, e/ou em uma região ao este dos Andes (Huber, 1904; Vavilov, 1951; Burret, 1933-34; Seibert, 1950; Prance, 1982; Clement *et al.*, 1987), onde foi domesticada uma só vez e logo difundido, existindo, portanto, um centro de origem concreto; (2) originou-se no ocidente da Colômbia e seu primeiro uso foi à utilização da madeira para a

fabricação de armas de guerra e, mais tarde, utilizou-se seu fruto - como na hipótese anterior, teve um centro de domesticação concreto (Patiño, 1989); (3) originou-se em uma extensa área que constituía sua distribuição natural que vai desde aproximadamente o paralelo 17° S em Bolívia-Brasil ao paralelo 12° N em Costa Rica, sempre ao longo e adjacente aos Andes, e nesses territórios a pupunha foi domesticada independentemente em várias localidades a partir de populações geneticamente diferentes (Mora Urpí, 1984). Mora Urpí acreditou que essa terceira hipótese era a mais correta em função da variabilidade fenotípica observada.

Vavilov (1951) citou a pupunha como originária da América do Sul, mas sem precisar o lugar exato. Seibert (1950) afirmou que a pupunha seria originária do nordeste do Peru, baseando sua hipótese na ocorrência de exemplares silvestres encontrados na Bacia do Rio Huallaga. Prance (1994) propôs a origem e domesticação no oeste da Bacia Amazônica, seguida pela introdução da pupunheira domesticada, no oeste e norte dos Andes: no oeste, através de passagens em locais de menor altitude dos Andes e no norte pelas viagens marítimas dos índios caribenhos.

A primeira evidência biológica concreta de uma região de origem foi apresentada recentemente por Ferreira (1999). Ele afirmou que as populações silvestres do Sudoeste da Hiléia Amazônica possuem a mesma posição do poro germinal da semente e o mesmo formato do endocarpo como nas populações domesticadas de toda a distribuição de pupunha cultivada. Essa informação não

identifica o número de domesticações, apenas a região mais provável para se procurar por mais informações. Análises moleculares (DNA) oferecerão a possibilidade de identificar o(s) local(is) exato(s) de sua domesticação, como feito em outras espécies recentemente.

Mora Urpí (1984) dividiu a distribuição da pupunha em duas áreas distintas: Oriental - incluindo a Amazônia e o norte da América do Sul; Ocidental - incluindo a América Central e o noroeste da América do Sul. Usou o Andes como divisor. As populações ocidentais possuem sistemas radiculares, estipes e folhas mais robustas, e mais espinhos em todas as partes, enquanto as populações orientais possuem sistemas radiculares menos robustos, estipes mais finos, folhas mais delicadas, menos espinhos e mais finos. Essas claras diferenças sugerem mais de uma domesticação, mas todas as populações possuem o mesmo formato de endocarpo e posição do poro germinal (Ferreira, 1999).

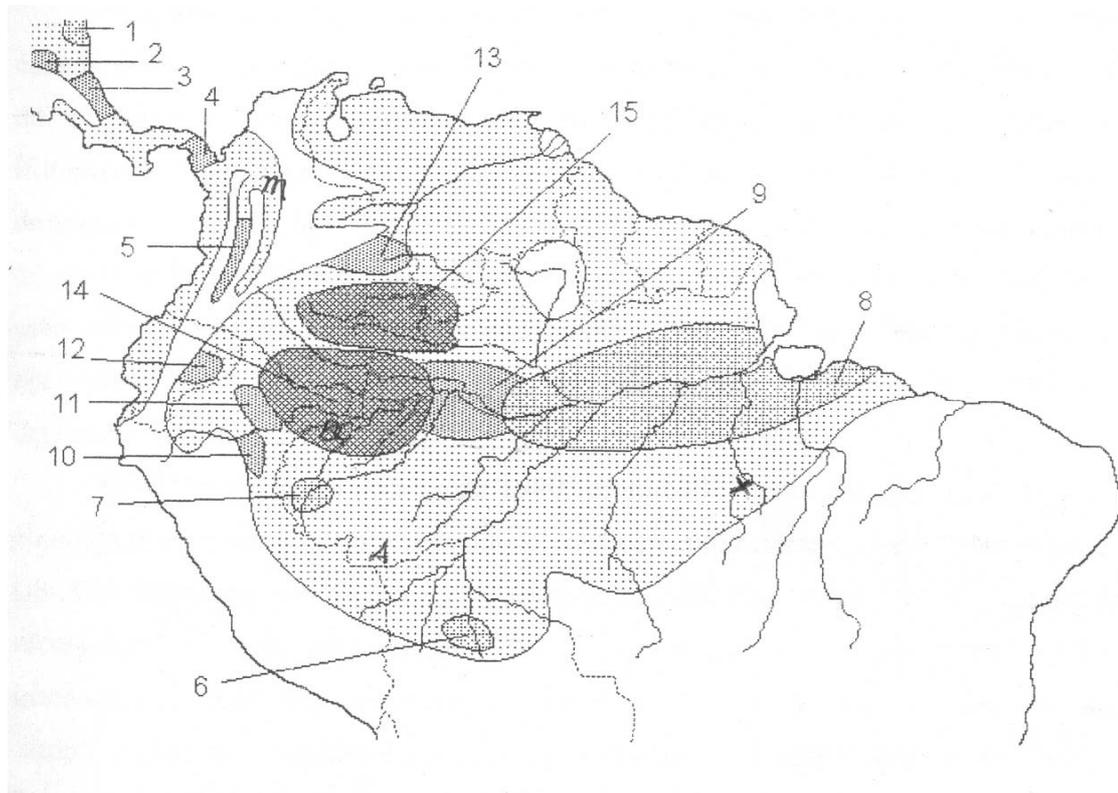


Figura. 1 – Distribuição de *B. gasipaes* var. *gasipaes* (sombra leve) e suas raças ocidentais (mesocarpa – 1. Rama, 2. Guatuso, 3. Utilis, 4. Tuíra, 5. Cauca) e as raças amazônicas (microcarpa – 6. Tembê, 7. Juruá, 8. Pará; mesocarpa – 9. Solimões, 10. P. Hermosa, 11. Tigre, 12. Pastaza, 13. Inirida; macrocarpa – 14. Putumayo, 15. Vaupés).

Mora Urpí & Clement (1988) dividiram as raças primitivas em três grupos, (Tabela 1) baseados no tamanho do fruto, e sugeriram que o tamanho reflete o grau de modificação devido à seleção humana durante o processo de domesticação (que também reflete a importância da pupunha a sua etnia humana associada). As raças "microcarpa" possuem frutos com peso médio < 20 g; as "mesocarpa" possuem frutos > 20 e < 70 g; e as "macrocarpa" possuem frutos > 70 g (chegando a 250 g). As raças primitivas mais derivadas (modificadas pela ação humana no

processo de domesticação) são as “macrocarpas” e estão localizadas na Amazônia Ocidental. Esta região poderia ser considerada o centro de diversidade genética da pupunha, pois contém frutos pequenos e grandes, com polpa oleosa a amídosa, vermelha a amarela, com diversos formatos e cores, bem como com plantas com e sem espinhos.

Seguindo a proposta original de Mora Urpí e Clement (1988), na Amazônia existem pelo menos oito raças primitivas de pupunha e ao Noroeste dos Andes existem pelo menos mais cinco raças. Acredita-se que existam mais raças a serem identificadas e descritas, pois a distribuição da pupunha é muito maior do que a área com as raças que já foram descritas (Figura 1).

Tabela. 1 – Raças de pupunha cultivada das classes “microcarpa”, “mesocarpa” e “macrocarpa” dos grupos Oriental e Ocidental (Mora Urpí, 1993, com modificações).

Grupo	Raça	Local	Peso fruto
Microcarpas cultivadas			
(20 g)			
Oriental	Juruá	Brasil, alto Rio Juruá	20 g
	Pará	Brasil, Pará	20 g
	Tembé	Bolívia, Chaparé, Sta. Cruz e Alto Beni	12 g
Mesocarpas cultivadas			
(20 a 70 g)			
Oriental	Inirida	Colômbia, Rio Inirida e Guaviare	62 g
	Pastaza	Equador, Província de Pastaza	23 g
	P. Hermosa	Peru, Pampa Hermosa (Loreto)	36 g
	Solimões	Brasil, Rio Solimões	42 g
	Tigre	Peru, Rio Tigre	63 g
Ocidental	Cauca	Colômbia, Valle del Cauca e Buenaventura	40 g
	Guatuso	Costa Rica, San Carlos	36 g
	Rama	Nicarágua, vertente do Caribe	31 g
	Tuíra	Panamá, Província de Darien	37 g
	Utilis	Panamá e Costa Rica, vert. Pacífico e Caribe	41 g
Macrocarpas			
(70 g)			
Oriental	Putumayo	Colômbia, Rio Putumayo; Brasil, alto Rio Solimões; Equador, Rio Napo; Peru, Rio Amazonas	111 g
	Vaupés	Colômbia, Rio Vaupés; Brasil, alto Rio Negro	139 g

As diversas raças possuem características morfológicas, químicas e organolépticas distintas (Clement & Mora Urpí, 1988; Mora Urpí & Clement, 1988; Clement & Arkcoll, 1991; Rojas *et al.*, 1994; Clement, 1995b; Fernández Piedra *et al.*, 1995; Clement *et al.*, 1998). Tão claras são essas diferenças que Mora Urpí & Clement (1987) sugeriram que diferentes raças poderiam servir como bases genéticas para diferentes programas de melhoramento genético. Por exemplo,

farinha para panificação pode ser obtido das raças “macrocarpa” Putumayo e Vaupés; fruto para consumo direto da raça “mesocarpa” Solimões; fruto para óleo da raça “microcarpa” Pará; palmito da raça “mesocarpa” Pampa Hermosa. Portanto, a disponibilidade de amostras representativas dessas raças é importante para os programas de melhoramento.

2.4. Domesticação e Raças

O processo de domesticação certamente iniciou-se de forma inconsciente, quando, por exemplo, um caçador, ou coletor comia um fruto especialmente saboroso e guardava a semente para plantar perto de sua habitação. Nesse caso, ocorria a seleção e a migração. Após o crescimento e florescimento dessa planta, a hibridação poderia ter iniciado, dando origem a progênies de maior diversidade que as populações originais. Com o tempo, as pessoas se tornaram conscientes do efeito de sua ação sobre as plantas e animais, transformando esse processo numa parte importante da sua adaptação ao ambiente.

As migrações humanas também favoreceram a ocorrência de hibridização entre populações distintas, liberando uma explosão de variabilidade fenotípica e genética. Essa variabilidade ofereceu maior oportunidade para a seleção humana, possivelmente estimulando o interesse dos primeiros povos pelos frutos das populações híbridas.

A continuação da domesticação da mesma espécie por diferentes tribos em diferentes regiões geográficas formou as raças primitivas. Essas raças distinguiram-se entre si por diversos aspectos do fenótipo e, conseqüentemente, do genótipo.

Mora Urpí (1988) definiu “raça” como sendo uma população ou grupo de populações que têm características semelhantes, dando a impressão de uniformidade dentro do grupo e da região, assumindo, também, que podem ter origem comum. Clement (1999) definiu “raça primitiva” como sendo uma população natural, cujo genótipo e fenótipo sofreram modificação pela intervenção humana. Valois *et al.* (1996) definem raça como sendo uma população com uma ou mais características peculiares, que a distingue de outras populações da mesma espécie, não sendo enquadradas sob categoria taxonômica.

Durante o processo de domesticação, a pupunha foi distribuída na maioria dos trópicos úmidos americanos, adaptando-se a um grande número de ambientes. Nesse processo de domesticação/distribuição, populações distintas entraram em contato reprodutivo, permitindo a explosão de diversidade fenotípica e genética mencionada acima. Isso, combinado com um grande número de preferências humanas, resultou na criação de muitas raças primitivas. Essas raças são conjuntos de populações domesticadas, sempre cultivadas, numa região geográfica restrita e que apresentam alta variabilidade fenotípica e razoável variabilidade genética, geralmente pela acumulação de genes e alelos de outras

populações e raças circunvizinhas. Essas raças foram criadas pelos primeiros povos americanos e cada uma apresenta características químicas, físicas e morfológicas próprias (Mora Urpí *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 1998) após serem selecionadas ao longo de milhares de anos de domesticação.

Provavelmente, a agricultura migratória empregada pelos primeiros povos foi muito eficiente para melhorar as plantas, pois cada roça recebia poucas sementes de pupunheiras selecionadas. Como essas roças eram relativamente isoladas dentro das florestas, o fluxo gênico era reduzido, tornando ainda mais completo o processo de fixação dos genes via cruzamentos endogâmicos (Clement, 1997, 1988).

Assim, possivelmente cada tribo indígena pode ter desenvolvido um diferente tipo de pupunha, chamado de raças primitivas (landraces): algumas populações amiláceas, outras mais oleosas; algumas com frutos grandes, outras com pequenos; algumas com muita, outras com pouca fibra; algumas ricas em caroteno, outras não; algumas com e outras sem espinhos e assim por diante. As raças primitivas mais derivadas dos ancestrais apresentam até 2000% de mudança quando comparadas com as populações silvestres que lhes deram origem (Clement, 1988). É evidente que a acumulação dessa variação levou muito tempo.

É provável que a domesticação da pupunha tenha começado antes da domesticação de cultivos anuais, pois o interesse inicial era sua madeira (Patiño, 1989), preferida para instrumentos de caça. Dessa forma, é possível imaginar que a

pupunha tenha começado a ser domesticada no final do Pleistoceno, há mais de 10 mil anos, época que combina melhor com o grau de mudança observado.

2.5. Disponibilidade de Recursos Genéticos

O primeiro passo para o melhoramento de qualquer espécie é a coleta, caracterização, avaliação e conservação do germoplasma do maior número possível de populações, para oferecer a maior diversidade genética ao melhorista (Simmonds, 1979; Esquinas-Alcazar, 1982). A coleção deve incluir germoplasma de populações locais de todas as partes de sua distribuição natural e, especialmente, do seu centro ou centros de origem, os centros de maior diversidade, ou ambos, pois estes últimos podem conter genes ou complexos de genes de grande importância econômica (Esquinas-Alcazar, 1982).

Um projeto pan-Americano foi criado (1983-1984) e financiado pela US-AID, com o objetivo de coletar recursos genéticos de pupunha em todos os cantos da bacia Amazônica, avaliar métodos para fazer uma coleção representativa e mapear a variabilidade genética da pupunha (Clement & Coradin, 1988). A análise dos resultados desse trabalho mostrou que existe uma hierarquia complexa de raças primitivas de pupunha na Amazônia e no resto da América Latina (Mora Urpí, 1984, 1992; Clement, 1988; Mora Urpí & Clement, 1988; Mora Urpí *et al.*, 1993). Essa

hierarquia ajudou a entender melhor a história da domesticação da pupunha, embora ainda não tenha esclarecido sua origem (Clement, 1995b). Este projeto contribuiu para estabelecer ou enriquecer coleções de germoplasma nos países participantes.

A América Latina possui numerosas coleções de germoplasma de pupunha, mas apenas o Brasil e a Costa Rica têm programas de melhoramento com escala e continuidade necessárias para obter resultados significativos, que são o programa do Instituto Agrônomo de Campinas e o da Universidade de Costa Rica, respectivamente. No entanto, vale ressaltar que o INPA tem contribuído de forma significativa para o avanço do conhecimento sobre os recursos genéticos da pupunha (Clement *et al.*, 1997a) e continua tentando utilizar esses recursos em benefício da agroindústria e dos pequenos produtores da Amazônia.

2.6. Pesquisas Realizadas com Recursos Genéticos

Desde o início da década de 1980, os trabalhos com os recursos genéticos da pupunha têm se tornado cada vez mais cientificamente orientados. Antes deste período, as coleções eram feitas casualmente, embora algumas tivessem uma boa representatividade geográfica. As primeiras pesquisas sobre os recursos genéticos de pupunha foram baseadas em descritores morfológicos, definindo uma lista de descritores para uso nas coleções e foi mapeada uma boa parte das raças de

pupunha da Amazônia. A grande maioria desses trabalhos ocorreu na Costa Rica, no entanto, são válidos também para o Brasil (Clement, 1996).

O estudo morfométrico realizado por Clement (1986) confirmou as diferenças entre o grupo das raças ocidentais e Amazônicas, apesar de não detectar diferenças entre as populações ocidentais estudadas. Por essa razão, e pela similaridade entre os frutos das cinco populações ocidentais do grupo mesocarpa, e a possibilidade da existência de um corredor entre a raça Putumayo (Amazônica) e o grupo ocidental na Colômbia, formulou-se a hipótese de que o grupo de populações ocidentais é o resultado de uma introdução tardia da pupunha já domesticada da Amazônia ao Ocidente. Assim, as diferenças detectadas se devem à deriva genética durante a migração, combinada com a introgressão com espécies afins previamente existentes na região.

Apesar de o emprego de germoplasma depender da caracterização e avaliação dos recursos genéticos, a eficiência da utilização também requer informação sobre a estrutura genética dos caracteres de interesse biológico, agrônômico e químico (Simmonds, 1979). Em geral, as informações disponíveis sobre a caracterização e avaliação de pupunha são deficientes, principalmente no Brasil e na América do Sul. Além dessas informações, a utilização requer clareza sobre o que deverá ser selecionado, com isso muitos ideótipos têm sido traçados para diferentes finalidades em diferentes instituições.

Na Amazônia, a utilização de recursos genéticos de pupunha tem sido caracterizada pela descontinuidade ao longo de duas décadas. O forte incremento de plantios de pupunha para palmito no Brasil (Bovi, 1997) é um fator positivo. No entanto, mais de 75% desse incremento ocorrem fora da Amazônia e, portanto, dificilmente as instituições dessa região poderão contar com o apoio dos principais produtores de pupunha.

2.7. Uso de Marcadores Moleculares em Pupunha

Um marcador molecular pode ser definido como todo e qualquer fenótipo decorrente de um gene expresso, como no caso de proteínas e caracteres morfológicos, ou de um segmento de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma), cuja seqüência e função pode ou não ser conhecida, e que possui comportamento de acordo com as leis básicas de herança (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual, como nanismo, deficiência clorofítica, cor de pétala ou morfologia foliar. Entretanto, o pequeno número de marcadores morfológicos distintos em uma mesma linhagem reduzia a

probabilidade de se encontrar associações significativas entre estes marcadores e caracteres de importância econômica em estudos de populações segregantes.

Os marcadores moleculares permitem gerar uma grande quantidade de informações sobre a diversidade genética e relações filogenéticas no germoplasma utilizado pelo melhorista. Eles permitem uma amostragem expressiva dos genomas de interesse ao nível de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Desta forma, esses marcadores são ferramentas extremamente importante para avaliar a variabilidade genética, mapear caracteres e determinar os melhores cruzamentos em diferentes plantas tropicais perenes.

Algumas das vantagens de marcadores moleculares sobre os morfológicos são listadas a seguir. (1) Muito esforço e planejamento são necessários para se construir um mapa genético a partir de marcadores morfológicos, uma vez que um número reduzido de marcadores por linhagens restringe a cobertura do genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Essa limitação geralmente leva o pesquisador a recorrer a um grande número de cruzamentos para efeito de estudo de ligação gênica. Por outro lado, um grande número de locos de marcadores moleculares podem ter seus alelos estudados em populações segregantes de cruzamentos específicos, facilitando o desenvolvimento de mapas genéticos. O nível de polimorfismo destes marcadores geralmente é alto para cada loco estudado, enquanto marcadores morfológicos possuem baixo nível de polimorfismo. (2) Marcadores moleculares são, em geral, neutros em relação a efeitos fenotípicos, com

mínimo ou nulo efeito epistático ou pleitrópico. Marcadores morfológicos muitas vezes coibem ou restringem o desenvolvimento normal da planta (albinos, mutantes clorofíticos) e seu controle genético pode afetar, ou ser afetado, por genes controlando outros caracteres, dificultando a caracterização dos genótipos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). (3) Em geral, marcadores moleculares são co-dominantes, contendo maior quantidade de informação genética por loco. Marcadores morfológicos, por sua vez, são em sua maioria dominantes ou recessivos (Tanksley, 1983b; Beckman & Soller, 1983; Burr *et al.*, 1983; Stuber, 1992).

Em palmeiras, a análise isoenzimática tem sido usada para quantificar a variabilidade genética e estudar sua distribuição entre populações de tâmara (*Phoenix dactylifera*) (Bennaceur *et al.*, 1991), dendê (*Elaeis guineensis*) (Ghesquière, 1984, 1985) e caiaué (*Elaeis oleifera*) (Ghesquière *et al.*, 1987). Portanto, seu uso em pupunha se justifica pelas mesmas razões e está começando a gerar resultados.

As isoenzimas também têm sido usadas no estudo da dispersão das espécies, na análise de filogenias, no melhoramento de plantas, na ligação e introgressão gênica, e na avaliação de germoplasma. Ao se usar enzimas para se estudar a variabilidade genética, encontramos duas limitações básicas: (1) O número total de locos que podem ser detectados no genoma, limitando assim a sua cobertura e não nos fornecendo uma resposta fidedigna; (2) O número de alelos por loco, isto é

o nível de polimorfismo genético detectável em cada loco (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Miranda (1993) extraiu isoenzimas de pólen da população de Yurimáguas e usou géis de poliacrilamida para visualizá-las. Concluiu que a pouca variação observada poderia ser uma das razões para a baixa viabilidade de pólen naquela população. Clement (1995b) verificou que o meristema do estipe possui muito mais enzimas com boa atividade e resolução do que o tecido foliar, material usado por Rojas Vargas (1993). Rojas Vargas (1993) determinou que a folha jovem possui o melhor tecido para extração de enzimas, e avaliou a atividade e resolução de 10 enzimas (ADH, ACP, EST, MDH, ME, PGI, PGM, PRX, SOD) em poliacrilamida.

Clement (1995b) encontrou atividade em 28 das 32 enzimas examinadas e 10 destas foram usadas para estudar a estrutura genética de uma amostra da população de Benjamin Constant (raça Putumayo). As 10 enzimas usadas tiveram 17 loci com interpretação genética confiável. A heterozigidade média (0,074) foi mais próxima de espécies autógamas do que de espécies alógamas, sugerindo a ocorrência do alto grau de autopolinização e de polinização entre plantas aparentadas. Esta baixa heterozigidade também explica a alta identidade genética de Nei entre as progênies estudadas. O mais surpreendente ainda foi a ausência de correlações significativas entre os parâmetros de crescimento e as heterozigidades, provavelmente devido ao alto grau de endogamia.

Clement *et al.* (1997) estudaram a variação isoenzimática em três populações de pupunha introduzidas no Havaí para usar no melhoramento genético da espécie para a produção de palmito fresco: Benjamin Constant (raça Putumayo), San Carlos (raça Guatuso) e Yurimáguas (raça Pampa Hermosa) e encontraram heterozigosidades variando de 0.05 (San Carlos) a 0.14 (Yurimáguas). Mesmo encontrando dois alelos privativos em San Carlos, as identidades genéticas de Nei sugeriram que as populações são muito relacionadas. Quando se retirava os dois únicos alelos da análise, a população de San Carlos se aproximava mais da de Benjamin Constant, sugerindo afinidade entre as raças do noroeste da Amazônia e as da América Central, como proposto por Clement (1986).

Recentemente foi avaliado com marcadores moleculares RAPDs a existência de três morfo-raças de pupunha ao longo do rio Amazonas e Solimões no Brasil. Morfo-raças de pupunha são raças que foram propostas com base na caracterização morfométrica, a partir de listas mínimas de descritores para uso *in situ* e *ex situ*. Essa caracterização permitiu a classificação das morfo-raças de pupunhas amazônicas (Mora Urpí & Clement, 1988). As morfo-raças avaliadas foram: Pará (Rio Amazonas), Solimões (baixo e médio Rio Solimões) e Putumayo (Alto Solimões) (Souza *et al.*, 2001). Existiam indicações de que a morfo-raça Solimões poderia ser artefato da análise morfométrica (Clement, 1986). De acordo com Sousa *et al.* (2001), o dendrograma gerado com RAPDs demonstrou a existência de dois grupos em lugar de três. O primeiro correspondeu a morfo-raça

Pará, validando-a. A estrutura do segundo grupo sugeriu que existe apenas uma morfo-raça ao longo do rio Solimões, pois as plantas amostradas foram misturadas em subgrupos sem ordem aparente e sem relação com as morfo-raças propostas (Solimões e Putumayo). Portanto, a análise genética não apoiou a hipótese de três raças. Esta sugeriu que a raça Putumayo estende-se ao longo de todo o rio Solimões.

Rodrigues (2001) analisou sete raças de pupunha com a técnica RAPD e observou que as raças mantidas no Banco Ativo de Germoplasma de Pupunha do INPA são muito relacionadas, embora exista um alto grau de polimorfismo nas populações dentro de cada uma. De acordo com a caracterização molecular feita, Rodrigues acreditou que haja uma só raça na América Central, que pode ser chamada de Útilis. Na Amazônia, ao longo do rio Solimões, também se sugere uma só raça, considerando que o nome Putumayo deve ser preservado. A antiga raça Solimões parece ser uma zona de hibridização ou introgressão entre as raças Pará e Putumayo. Essa análise validou a existência das raças Pará e Pampa Hermosa; neste caso as interpretações morfológica e genética estão de acordo. A nova interpretação dessas raças também apóia a hipótese de uma única origem para a pupunha no sudoeste da Amazônia, com duas vertentes migratórias: uma para o Oriente e outra para o Ocidente até a América Central (Rodrigues, 2001).

Adin *et al.* (2004) utilizaram a técnica de AFLP para comparar a diversidade genética entre populações de pupunha ao longo dos rios Paranapura e Cuiparillo, (Amazônia Peruana) que são habitados principalmente por indígenas e

colonos, respectivamente. Estas populações de pupunha são partes da raça primitiva Pampa Hermosa, que fornecem a maioria das sementes comercializadas no Brasil para atender à demanda do agronegócio de palmito. A diversidade genética (heterozigosidade observada) foi de 0,2629 ao longo do rio Paranapura e 0,2534 ao longo do rio Cuiparillo. A diferenciação genética (G_{st}) encontrada entre as populações variou de 0,0377 a 0,0416 ($p < 0,01$) entre as sub-populações ao longo de ambos os rios. A comparação com amostras de outras raças demonstrou a existência de diferenciação genética entre essas raças, corroborando os dados de Rodrigues (2001).

2.7.1. A Técnica RAPD

Um dos aspectos mais fundamentais da revolução causada pela PCR (Polymerase Chain Reaction) foi a possibilidade de gerar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma. DNA em grande quantidade pode ser facilmente detectado a olho nu no gel de eletroforese por meio do uso de corantes específicos para o DNA (ex. brometo de etídio). Entretanto, a técnica de PCR ainda apresenta uma limitação significativa na obtenção de marcadores moleculares anônimos distribuídos pelo genoma. A construção de primers para a amplificação via PCR dependia essencialmente do conhecimento prévio das sequências de nucleotídeos que flanqueiam a sequência de DNA de interesse. Para se conhecer

estas sequências é necessária a clonagem e sequenciamento da região. Em vista disso, com exceção de alguns genes de sequência conhecida, a PCR apresentou, de início, um uso limitado como técnica para a obtenção de marcadores moleculares.

O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar “primers” mais curtos e de sequência arbitrária para dirigir a reação de amplificação. Uma derivação da PCR tem sido muito utilizada em pesquisa, principalmente em análise de variabilidade genética: a técnica de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA). A técnica RAPD envolve a amplificação simultânea de vários locos anônimos no genoma utilizando iniciadores de sequência arbitrária (Williams *et al.*, 1990).

Desde sua descrição, o uso de marcadores RAPD na análise genética e no melhoramento de plantas têm tido uma difusão extremamente rápida, sendo o marcador de maior utilização com vegetais durante algum tempo, devido a sua facilidade de utilização, rapidez, versatilidade e baixo custo. Esse tipo de marcador possibilita gerar grande número de informações em curto tempo e por um custo acessível, possibilitando sua fácil utilização na maioria dos programas de melhoramento, sendo, portanto, ferramenta útil, acessível e de fácil aplicabilidade (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A PCR é um método concebido por Mullis & Faloona (1987), que permite a amplificação *in vitro* de uma sequência de DNA específica, utilizando-se

dois iniciadores (oligonucleotídeos) de 18 a 30 nucleotídeos que hibridizam com as fitas opostas, em regiões próximas do segmento a ser amplificado. A análise baseada na PCR requer informação prévia da seqüência de ligação, complementar a um par de iniciadores (oligonucleotídeos) no DNA molde (Williams *et al.*, 1990). O RAPD é basicamente uma reação de PCR, com duas características distintas: a) utiliza um iniciador único ao invés de um par de iniciadores, com tamanho de 10 bases; b) o iniciador único tem seqüência arbitrária e, portanto, a seqüência que será amplificada é desconhecida.

O aperfeiçoamento desta técnica foi paralela e independentemente desenvolvido por dois grupos de pesquisa. O grupo de Williams *et al.* (1990), que denominou essa técnica de análise como RAPD (amplificação ao acaso de fragmentos polimórficos de DNA). O grupo do Instituto de Pesquisas Biológicas da Califórnia, liderado por Welsh & McClelland (1990), propôs uma denominação mais apropriada para a técnica, chamando-a de AP-PCR (Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction), uma vez que os iniciadores possuem seqüência arbitrária, mas a amplificação tecnicamente não ocorre ao acaso e sim em lugares específicos no genoma.

O processo de RAPD consiste de três etapas principais: desnaturação, anelamento e extensão. O DNA molde é desnaturado pela elevação da temperatura para 92° C a 95° C. O anelamento dos iniciadores ao DNA ocorre à temperatura de 35° C a 60° C (esta temperatura dependerá da Temperatura Média (T_m) calculada,

isto é, a seqüência e o tamanho do iniciador utilizado). A extensão da nova fita de DNA é feita a partir de cada terminal 3' dos iniciadores com a DNA-polimerase e desoxiribonucleosídeos trifosfatos pela elevação da temperatura para 72° C. A repetição destas etapas por 20 a 40 ciclos permite a amplificação de segmentos DNA seguindo uma progressão geométrica (Williams *et al.*, 1990).

As aplicações da técnica RAPD são: obtenção de "fingerprints" genômicos de indivíduos, variedades e populações; a análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma; estabelecimento do relacionamento filogenético entre diferentes espécies e/ou populações; a construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e a localização de genes de interesse econômico (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

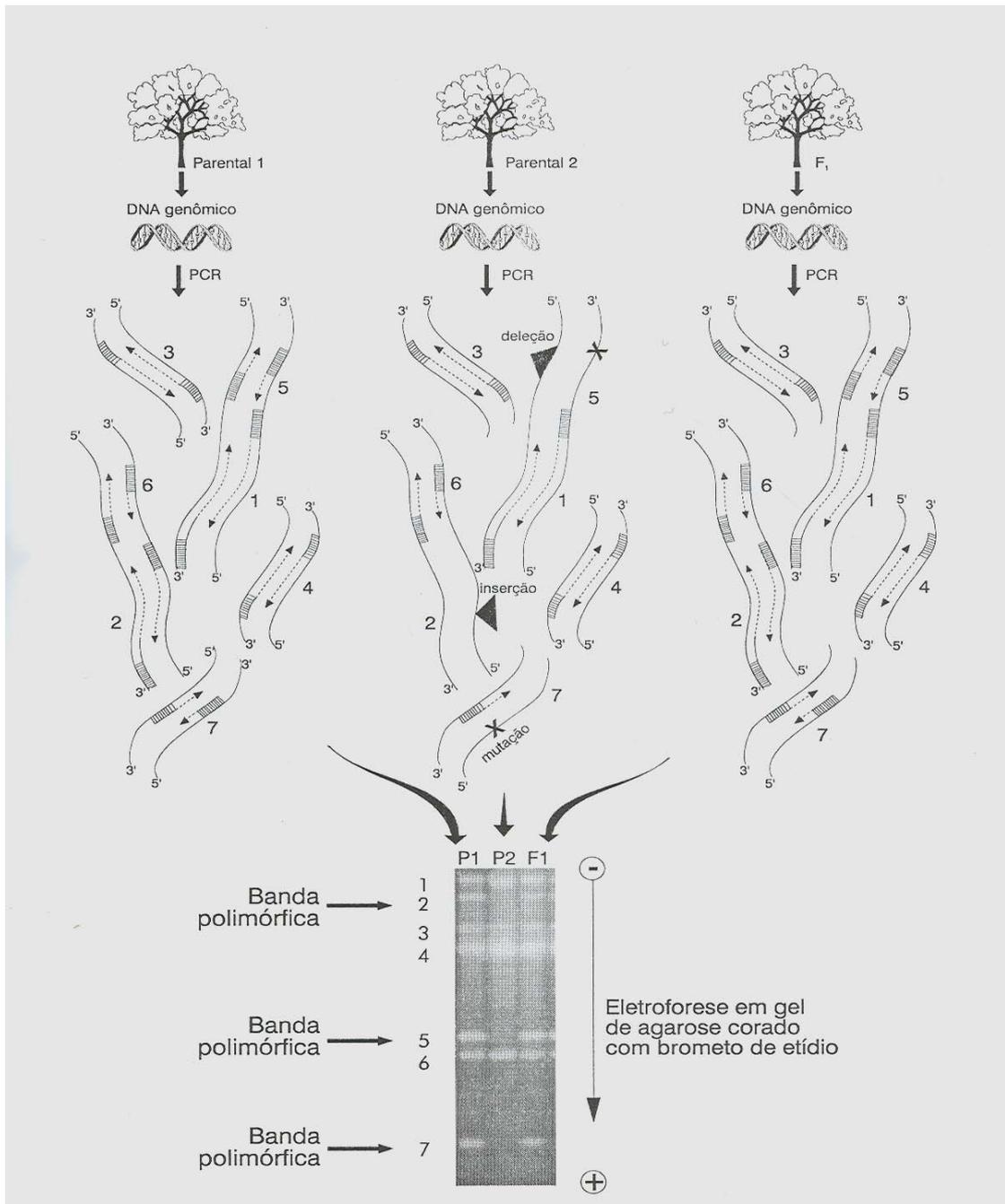
2.7.2. Base Genética dos Marcadores RAPD

Para que haja amplificação de um fragmento RAPD no genoma analisado, duas seqüências de DNA complementares ao "primer" arbitrário devem estar suficientemente adjacentes e em orientação oposta, de maneira a permitir a amplificação exponencial de um segmento de DNA pela DNA-polimerase. Em função da grande quantidade de DNA produzido, este segmento pode ser visualizado diretamente na forma de uma banda num gel de eletroforese. Cada primer arbitrário

utilizado dirige a síntese de vários segmentos de DNA simultaneamente em diversos pontos do genoma, resultando assim em várias bandas no gel (Figura 2).

A natureza molecular do polimorfismo RAPD não é inteiramente conhecida. Entretanto, evidências experimentais indicam que diferenças de apenas um par de bases (mutações de ponto) são suficientes para causar a não complementariedade do primer com o sítio de iniciação e assim impedir a amplificação de um segmento (Williams *et al.*, 1990). Outras fontes de polimorfismos podem incluir deleções de sítios de iniciação ou inserções que colocam dois sítios de iniciação adjacentes a uma distância acima daquela que a DNA polimerase é capaz de percorrer. Assim, o polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, o segmento amplificado (banda no gel) pode estar presente ou ausente.

Fig. 2 - Base genética de marcadores moleculares RAPD (Ferreira & Grattapaglia, 1988).



2.8. Métodos Estatísticos Aplicados na Análise Genética

Os estudos de divergências genéticas e relações filogenéticas, entre e dentro de espécies vegetais de interesse agrícola, têm sido uma das contribuições mais concretas de marcadores moleculares aos estudos sobre germoplasma em apoio à genética e melhoramento de plantas. A avaliação da divergência genética por marcadores moleculares apresenta algumas vantagens sobre outros métodos, pois além de identificarem polimorfismo, não apresentam interação entre caracteres, podendo ainda, serem avaliados em qualquer estágio de desenvolvimento (Williams *et al.*, 1990).

O estabelecimento de uma medida (coeficiente) de similaridade/dissimilaridade entre dois indivíduos constitui um ponto de partida para várias técnicas de análise multivariada. Muitos coeficientes de similaridades têm sido propostos (Sokal & Sneath, 1963). Os mais simples relacionam-se com variáveis dicotômicas, onde cada variável tem somente dois valores possíveis. Os marcadores do tipo RAPD são binários e, portanto, são incluídos neste grupo (Duarte, 1998).

Levando-se em consideração a base genética dos marcadores RAPD (Williams *et al.*, 1990), observa-se que a ausência de amplificação de uma determinada banda em dois genótipos não representa necessariamente semelhança genética entre estes, o que faz com que aqueles coeficientes que excluem estas co-

ocorrências negativas de sua expressão de similaridade (Jaccard, Sorensen-Dice, Ochiai, Anderberg, etc.), a princípio, sejam mais adequados para uso com este tipo de marcador. Sokal & Sneath (1963) recomendaram ainda que, quanto mais simples for o coeficiente, mais fácil se dá a sua interpretação e, por isso, deve ser preferencialmente utilizado.

O polimorfismo observado quando usado a técnica RAPD é identificado como um fragmento de DNA amplificado em um indivíduo e não amplificado em outro. Este fragmento apresenta herança mendeliana simples, embora a natureza molecular do polimorfismo RAPD não seja inteiramente conhecida (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Entretanto, evidências experimentais indicam que diferenças de apenas um par de bases (mutações de ponto) são suficientes para acusar a não complementariedade do iniciador com a sequência de iniciação e assim impedir a amplificação de um segmento (Williams *et al.*, 1990). Outras fontes de polimorfismo podem incluir deleções de sequências de iniciação ou inserções que colocam duas sequências de iniciação adjacentes a uma distância daquela que a DNA polimerase é capaz de percorrer. Assim, o polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, o segmento amplificado (banda no gel) está presente ou ausente.

Além da análise de polimorfismo, o conhecimento da frequência de heterozigotos é importante, já que cada heterozigoto carrega alelos diferentes e representa a existência de variação. A medida amostral da variação genética em uma

população é a heterozigosidade observada (geralmente referente para um único loco ou para uma proporção de vários locos) e esta pode ser comparada com a heterozigosidade estimada para se ter uma idéia do grau de endogamia existente na população (Futuyma, 1992).

Estudos de divergência genética têm sido uma das contribuições mais concretas dos marcadores moleculares à organização de germoplasma e à genética e melhoramento de plantas. Nestes estudos, freqüentemente são utilizadas técnicas multivariadas como as análises de agrupamento e ordenação para uma representação simplificada dos resultados, sendo que um precursor destas análises é a construção de uma matriz de similaridade (distância) entre as plantas que estão sendo estudadas.

Em estudos de divergência com marcadores moleculares, um dos métodos de agrupamento mais utilizados para a construção de dendrogramas é a média aritmética entre pares não ponderados, comumente denominado UPGMA (Mumm & Dudley, 1994). Este é um tipo de agrupamento no qual a distância entre dois “clusters” é a média das distâncias entre todos os pares possíveis de indivíduos, um de um grupo e um de outro (Kotz & Johnson, 1985).

As distâncias genéticas são utilizadas para estudar o processo evolutivo das espécies, identificar combinações híbridas superiores de genitores via a identificação de um conjunto gênico mais amplo, bem como avaliar variabilidade

genética dos cruzamentos (Morais, 1992). A divergência genética mais comumente usada é a Distância de Nei, que permite estudar as populações de acordo com a sua aproximação filogenética.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 200 plantas de 8 raças primitivas de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth, var. *gasipaes*) e 18 plantas de duas populações silvestres (*B. gasipaes* var. *chichagui*), sendo uma do rio Magdalena, Colômbia (n=05) e outra do rio Xingu, Pará, Brasil (n=13), que foram utilizadas como “out groups”, e uma planta da raça Juruá, que foi utilizada como controle nos géis (com uma réplica na lateral esquerda e uma no meio do gel). As raças primitivas analisadas foram Putumayo (30, sendo 15 da distribuição da velha raça Solimões e 15 da distribuição original da raça Putumayo), Pará (30), Utilis (30, sendo 10 da distribuição da velha raça Tuíra, 10 da velha raça Guatuso, e 10 da distribuição original da raça Utilis), Pampa Hermosa (30), Juruá (30), Vaupés (15), Cauca (11) e Inirida (06), todas mantidas no Banco Ativo Germoplasma de Pupunha (BAG-Pupunha) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), BR 174, km 38, Manaus, AM, Brasil. A seleção das amostras das raças Putumayo e Utilis foram desenhadas para validar as análises de Rodrigues (2001). Os acessos amostrados foram selecionados para se ter uma boa cobertura geográfica das raças e as plantas foram amostradas ao acaso. A identificação exata das amostras se encontra no Apêndice 1.

3.1. Extração e Amplificação de DNA e Eletroforese

O DNA foi extraído com o DNesy Plant Mini-kit da Quiagen, utilizando-se 100 mg do meristema apical de um estipe lateral, como praticado por Clement *et al.* (1997) na extração de enzimas, e quantificado em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Obteve-se em média 14 µg de DNA. Na ausência de estipe lateral, utilizou-se 200 mg de folhas, submetidas à maceração com auxílio de pistilo e nitrogênio líquido (Weising *et al.*, 1995), com a obtenção média de 4 µg de DNA. No caso das populações silvestres (var. *chichagui*), o DNA foi extraído dos embriões das sementes, pois estas não germinavam com bastante rapidez para extrair o DNA do palmito. Obteve-se uma média de 6 a 10 µg de DNA.

Os RAPDs foram amplificados conforme Williams *et al.* (1990), com modificações. Cada reação de amplificação, em volume final de 30 µl, continha 10 ng de DNA genômico (5 ng/µl), 250 µM de dNTP (2,5 mM), 3 mM de MgCl₂ (25 mM), 50 ng do iniciador (10 ng/µl) (Tabela 2), 1,5 U de enzima Taq polimerase (CENBIOT/RS).

As amostras foram amplificadas em termociclador (Perkin Elmer 9600) com dois programas (de acordo com o iniciador utilizado, seguindo Rodrigues, 2001). Programa 1 (F-919-3): 1 etapa de 2 min a 94°C, 40 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min a 36°C e 2 min a 72°C, mais 1 etapa de 3 min a 72°C. Programa 2

(OPA-4, OPA-5, OPA-8, OPA-9, OPA-18, OPA-20, FC13): 2 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 36°C e 2 min a 72°C, e 33 ciclos de 10 seg a 94° C, 20 seg a 40° C, 2 min a 72°C, mais 1 etapa de 5 min a 72° C. A utilização de dois programas de amplificação se deve ao fato de alguns iniciadores, como o F-919-3, terem mais resolução com o programa 1.(Tabela 2).

Tabela 2 – Iniciadores utilizados na análise e suas respectivas seqüências de bases.

Iniciador	Seqüência (5' - 3')	Iniciador	Seqüência (5' - 3')
OPA-4 ¹	AATCGGGCTG	OPA-9	GGGTAAGGCC
OPA-5	AGGGGTCTTG	OPA-18	AGGTGACCGT
OPA-8	GTGACGTAGC	OPA-20	GTTGCGATCC
FC13	AGACGTCCAC	F-919-3	CAGGGGTGGA

1. OPA, são iniciadores da (Operon Technologies); 2. FC13 e F-919-3 iniciadores desenhados para o fungo “*Guinardia sp*”.

Após a amplificação, os produtos da reação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão TBE a 120 V por 4 horas, corados com brometo de etídio de 0,5 mg/ml, visualizados em Stratagene Eagle Eye II, e copiados em disquetes para posterior análise. Os géis continham em média 27 a 30 amostras de pupunha, incluindo representantes de todas as raças, duas amostras controles (raça Juruá) e marcador de peso molecular (1 Kb ladder, Gibco) nas extremidades.

Bandas polimórficas e monomórficas foram classificadas como presentes (1) ou ausentes (0), baseando-se na resolução e grau de amplificação por meio da avaliação visual, como descrito por Grattapaglia (1998). Para avaliar a

confiabilidade das interpretações, comparou-se as similaridades de Jaccard dos indivíduos controles de todos os géis analisados.

3.2. Análise Genética e Estatística dos Dados

Com o programa NTSYS-pc (Rohlf, 1990) gerou-se uma matriz de similaridade de Jaccard para os indivíduos controle, para verificar o grau de replicabilidade, como feito por Rodrigues (2001), já que os RAPDs são os marcadores moleculares menos replicáveis (Ferreira & Grattapaglia, 1988). Estimou-se a heterozigosidade a partir da matriz binária, assumindo a ausência de bandas como recessivo (Weir, 1996), e a porcentagem de polimorfismo (95% e 99%), usando o critério de Nei (1972), para todas as raças, com o programa TFPGA (Miller, 1997).

Estimou-se as distâncias genéticas de Nei (1972) entre as raças, com o programa TFPGA (Miller, 1997), e a partir dos índices de dissimilaridade gerou-se um dendrograma com o algoritmo UPGMA. O Exact teste de Fisher (Raymond & Rosset, 1995) foi usado para determinar as diferenças significativas nas frequências alélicas entre as raças, com o programa TFPGA (Miller, 1997).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Reprodutibilidade da Reação RAPD

Para testar a reprodutibilidade dos RAPDs utilizou-se um indivíduo da raça Juruá em todos os géis como controle. A média das similaridades de Jaccard do controle foi de 0,96 ($\pm 0,025$; máximo = 1,0; mínimo = 0,931), refletindo um alto grau de reprodutibilidade entre os indivíduos. Este valor foi similar ao de Rodrigues (2001) em ensaios independentes.

Embora a reprodutibilidade interna desta análise foi similar à de Rodrigues (2001), um maior número de marcadores foi gerado, com alguns marcadores novos e outros marcadores não resolvidos, de forma que não foi possível comparar diretamente as matrizes. Este resultado não foi esperado, pois usou-se os mesmos iniciadores e as mesmas reações químicas. Somente o equipamento usado foi diferente. Esta falta de reprodutibilidade entre conjuntos de análises ainda será avaliada em maiores detalhes, embora não sendo possível para esta dissertação.

4.2. Análise Genética das Raças

Os 8 iniciadores geraram 124 produtos de amplificação (bandas) com uma média de 15,5 bandas por iniciador. Destes produtos de amplificação, 101

foram polimórficas (81,5%) (Tabela 3), apenas um pouco menor que o polimorfismo obtido por Barbosa (1997) – 92,5%, Sousa *et al.* (2001) – 88% e Rodrigues (2001) – 89% com a técnica RAPD em estudos com a pupunha.

Houve variação no total de bandas polimórficas, com um mínimo no iniciador OPA-9 (8 bandas) e máximos nos iniciadores OPA-20 e OPA-4 (17 bandas). Houve também variação dentro das raças, com apenas 5 bandas na raça Juruá (OPA-9) e 17 bandas nas raças Pará e Putumayo, com o iniciador OPA-20 (Tabela 3). As raças amazônicas apresentaram um maior polimorfismo, também observado por Rodrigues (2001), com uma média de 87,8 bandas, quando comparadas com a raça da América Central (média = 83,5 entre as 3 populações).

Tabela 3 - Número de marcadores úteis obtidos de cada iniciador nas 8 raças de pupunha (*B. gasipaes*) e duas populações de *B. gasipaes* var. *chichagui*, e número de marcadores polimórficos para cada raça.

Iniciador	Total	Polimórficos									
		Total	Pará	Putum	Utilis	Pampa	Vaupés	Cauca	Inirida	Juruá	<i>chich.</i>
F-919-3	17	12	10	11	10	12	10	9	9	10	10*
OPA-20	17	17	17	17	16	15	16	12	16	16	-
OPA-9	12	8	8	7	6	6	6	6	6	5	-
FC-13	15	9	9	8	9	9	9	8	9	8	-
OPA-5	16	13	11	12	11	12	13	11	10	12	-
OPA-8	16	15	15	14	15	14	14	12	8	15	13
OPA-18	13	10	9	9	9	9	9	9	7	10	10
OPA-4	18	17	14	13	13	14	10	11	10	14	17
Total	124	101	93	91	89	91	87	78	75	90	50

* Apenas 4 iniciadores foram utilizados (os mais polimórficos, segundo Rodrigues 2001) para a análise dos “out groups”, devido a pouca quantidade de DNA para cada indivíduo. (6 - 10µg).

Pelo exact teste (Raymond & Rosset, 1995) verificou-se as diferenças entre as frequências alélicas das populações para determinar se estas poderiam ser juntadas em raças, como feito por Rodrigues (2001). As populações que representaram as raças Putumayo e Solimões originais não apresentaram diferenças ($p = 1$), sendo, portanto, consideradas uma única raça, como demonstrado por Souza *et al.* (2001) e Rodrigues (2001). As populações de Útilis, Tuíra e Guatuso também não foram diferentes ($p = 1$). Portanto, as populações de Putumayo e Solimões serão tratadas nessa análise como uma única raça e o nome Putumayo permanecerá. O mesmo será feito para as populações de Útilis, Tuíra e Guatuso, que serão tratadas como Útilis em todas as análises seguintes, como sugerido por Rodrigues (2001).

A heterozigosidade observada deste conjunto de raças e populações foi 0,38 e a % de polimorfismo foi de 93% (Tabela 3). Rodrigues (2001) obteve resultados um pouco menores, com heterozigosidade (0,31) e % de polimorfismo (89,4%), mas que reflete a concordância entre as análises. A estimativa de heterozigosidade obtida com os marcadores RAPD pode ser superestimada por ser calculada a partir da estimativa das frequências gênicas do homozigoto nulo (Weir, 1996), já que os RAPDs são dominantes e não permitem distinguir heterozigoto e homozigoto. (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

As heterozigosidades observadas nas raças amazônicas com 30 plantas foram maiores que a heterozigosidade na raça da América Central, como também observado por Rodrigues (2001). As % de polimorfismos nas raças Amazônicas

também foram maiores. O alto polimorfismo observado entre as plantas das raças de pupunha cultivada reflete a alta variabilidade genética que esta espécie possui e que também se manifesta em suas características morfológicas (Mora Urpí, 1991).

O curioso neste conjunto de informações é a baixa heterozigosidade e % de polimorfismo das populações silvestres, ao redor de um terço dos valores das raças primitivas, o que pode ser devido ao pequeno número de amostras e iniciadores usados. A maioria dos marcadores não polimórficos foi monomórfico pela ausência de bandas. Monomorfismo com ausência de bandas sugere que houve mutação na seqüência homóloga ao iniciador, portanto não ocorrendo geração de fragmentos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Tabela 4 - Heterozigosidade e % de loci polimórficos (95% e 99%) das raças de *Bactris gasipaes*, da Amazônia, América Central, e das populações de *B. gasipaes* var *chichagui*.

Raça	Nº	Heterozigosidade		% de Polimorfismo	
		Observada	Esperada	95%	99%
Pará	30	0,30	0,31	75	75
Putumayo	30	0,28	0,29	72	73
Pampa Hermosa	30	0,28	0,29	72	73
Juruá	30	0,30	0,30	72	72
Utilis	30	0,29	0,30	71	71
Vaupés	15	0,28	0,29	69	71
Cauca	11	0,24	0,25	60	63
Inirida	6	0,23	0,25	60	60
<i>Chich.</i> Magdalena	5	0,10	0,11	26	26
<i>Chich.</i> Xingu	13	0,13	0,13	33	37
Geral	200	0,38	0,38	93	93

No dendrograma baseado nas distâncias de Nei (1972), com as mesmas quatro raças analisadas por Rodrigues (2001), houve a formação de dois grupos (Figura 3), sendo o primeiro grupo formado pelas raças Putumayo, Utilis e Pampa Hermosa, e o segundo pela raça Pará. A estrutura do dendrograma foi similar ao de Rodrigues (2001), embora a raça Útilis tenha se juntado à raça Putumayo antes que as duas se juntassem à raça Pampa Hermosa, como observado por Rodrigues (2001). As consistências destes agrupamentos foram também similares às de Rodrigues (2001), sugerindo que isso ocorreu devido às pequenas diferenças nos marcadores usados e, possivelmente, em diferenças nas frequências alélicas entre as amostras.

A maior similaridade entre a análise de Rodrigues (2001) e as apresentadas aqui (Figura 3) é a posição da raça Pará. Este posicionamento sugere que a análise atual reflete bem as diferenças genéticas entre as raças ocidentais e a raça Pará, e sugere que a presente análise valida a de Rodrigues, mesmo não sendo possível comparar diretamente as matrizes por ter diferentes marcadores.

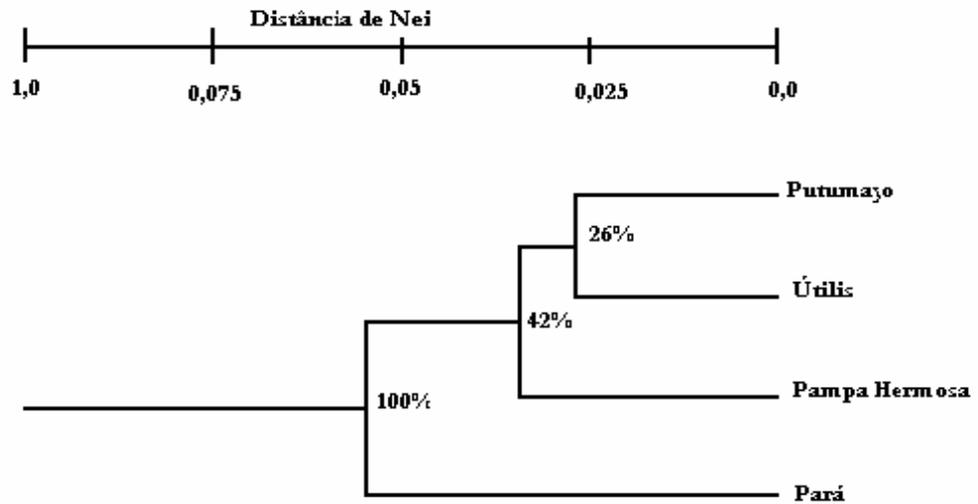


Figura. 3 - Dendrograma baseado nas distâncias de Nei (1972) entre as raças da Amazônia e América Central. A consistência dos nós está em porcentagem dos marcadores que os apóiam.

A raça Juruá é a única do novo conjunto de populações que apresenta suficientes plantas ($n = 30$) para se confiar razoavelmente nas suas relações com as outras (Figura 4). Seu posicionamento junto às três raças ocidentais faz sentido geográfico e sugere que as similaridades genéticas são devido a origem comum deste conjunto de raças. Verificou-se que a raça Pará continua separada das demais raças.

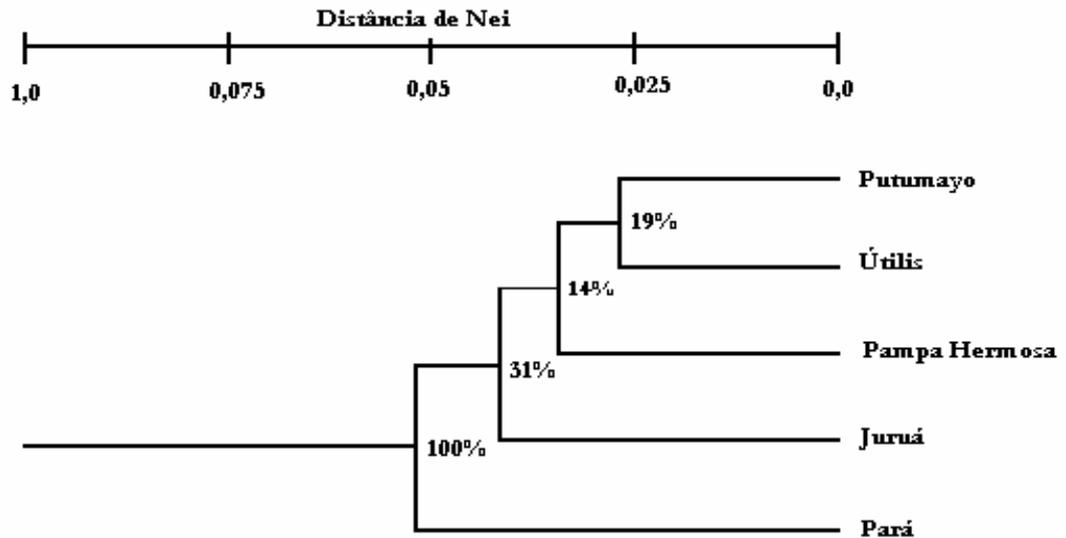


Figura. 4 - Dendrograma baseado nas distâncias de Nei (1972) entre as raças da Amazônia e América Central. A raça Juruá foi aqui incluída. A consistência dos nós está em porcentagem dos marcadores que os apoiam.

As outras raças possuem números de indivíduos pequenos (n de 6 a 15), o que não permite muita confiança nas relações filogenéticas com as raças melhores representadas. No entanto, o dendrograma com todas estas raças (Figura 5) permite fazer algumas considerações. Primeiro, a raça Pará separou-se de todas as raças, sugerindo que todas as raças e populações de Amazônia Ocidental e noroeste de América do Sul originaram-se da mesma região no sudeste da Amazônia, como sugerido por Rodrigues (2001). As duas populações silvestres (*var. chichagui* dos rios Magdalena e Xingu) são muito diferentes das raças cultivadas, muito mais diferentes de que as populações silvestres de Acre e Benjamin Constant (Amazonas) usadas por Rodrigues (2001), o que sugere que estas duas populações novas não participaram da origem da pupunha cultivada.

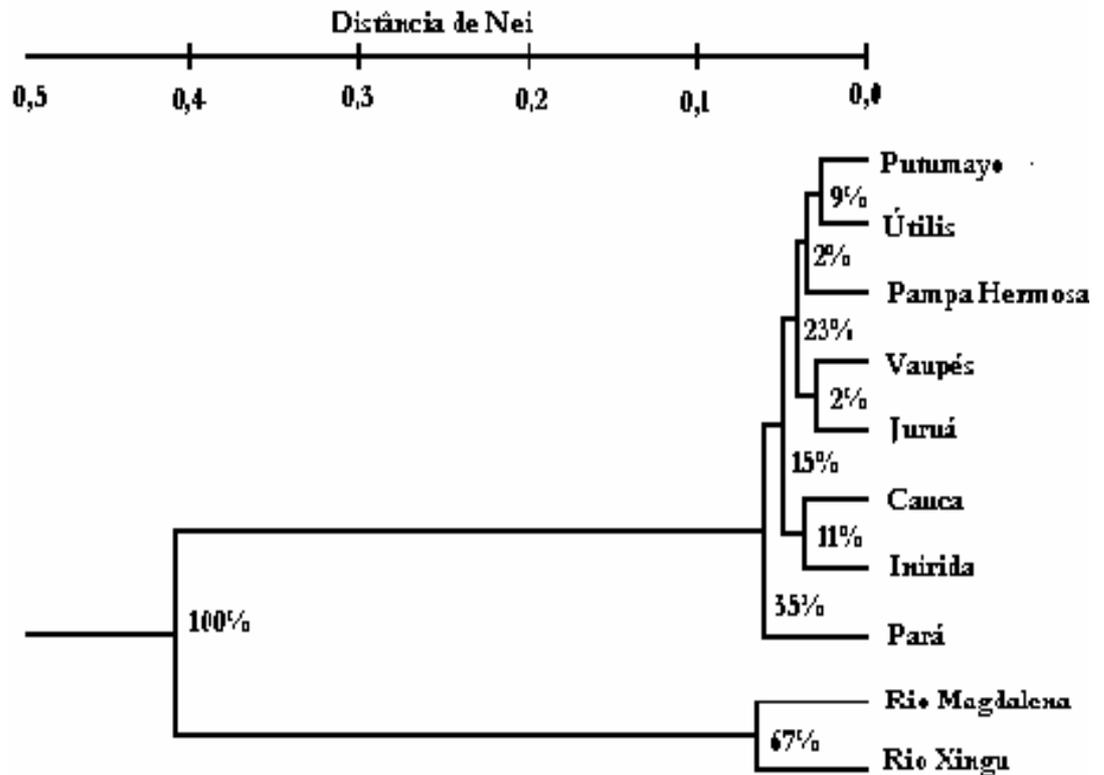


Figura. 5 - Dendrograma baseado nas Distâncias de Nei (1972) com as oito raças de pupunha e dois “out groups”. A consistência dos nós está em porcentagem dos marcadores que os apóiam.

Os agrupamentos problemáticos neste dendrograma (Figura 5) são as raças Vaupés com a raça Juruá, pois as duas raças estão distantes geograficamente e possuem formatos e tamanhos de fruto muito diferentes. Mora Urpí & Clement (1988) classificaram a Juruá como uma raça microcarpa e a Vaupés como macrocarpa, e estas somente estariam relacionadas se fossem geograficamente próximas. A relação entre Cauca e Inirida também é problemática, pois estas encontram-se geograficamente separadas. Mais importante ainda, a raça Inirida é próxima (vizinho) a Vaupés e possui formato de fruto similar (achatado). *A priori*,

uma relação entre Inirida e Vaupés havia sido postulada. A ausência da relação deveria ser atribuída à amostra pouca representativa. Também a raça Cauca é geograficamente intermediária entre a Putumayo e a Útilis, e esta relação não é evidente no dendrograma. Estes problemas somente podem ser resolvidos com novas coletas de germoplasma nas áreas geográficas apropriadas com um número mais apropriado de indivíduos.

5. CONCLUSÕES

As raças de pupunha analisadas nesse estudo foram muito relacionadas, embora apresentem um alto grau de polimorfismo e heterozigosidade individual. A análise confirmou as quatro raças analisadas por Rodrigues (2001), especialmente a separação da raça Pará das demais. Embora não sendo possível comparar diretamente as matrizes por apresentarem quantidades de marcadores diferentes, a presente análise valida a de Rodrigues (2001). A raça Juruá mostrou posicionamento junto às três raças ocidentais (Putumayo, Utilis e Pampa Hermosa), fazendo sentido geográfico, e sugere que as similaridades genéticas são devido a origem comum deste conjunto de raças. As outras raças (Vaupés, Cauca e Inirida) foram representadas por números de indivíduos muito reduzidos, não permitindo uma conclusão mais precisa, porém sugerem que todas as raças e populações de Amazônia Ocidental e do noroeste de América do Sul originaram da mesma região no sudeste da Amazônia. As duas populações silvestres (var. *chichagui* dos rios Magdalena e Xingu) foram muito diferentes das raças cultivadas, muito mais diferentes do que as populações silvestres de Acre e Benjamin Constant (Amazonas) usadas por Rodrigues (2001), o que sugere que estas duas populações novas não participaram da origem da pupunha.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, A. M. M. **Análise da variabilidade genética em progênes de pupunha (*Bactris gasipaes* H. B. K.)**. São Paulo: UNESP, 1997. Dissertação de Mestrado, Jaboticabal, 1997.

BROWN, A. H. D; MARSHALL, D. R. **A basic sampling strategy: theory and practice**. In: GUARINO, L; RAO, V. R; REID, R. **Collecting plant genetic resources: technical guidelines**. Wallingford, UK: CAB International, 1995. p. 75-92.

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

CLEMENT, C. R; AGUIAR, J. P. L; ARKCOLL, D. B; FIRMINO, J. L; LEANDRO, R. C. **Pupunha brava (*Bactris dahlgreniana* Glassman): progenitora da pupunha (*B. gasipaes* H. B. K)?** Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Botânica, 1989. 5 (1): 39-55.

CLEMENT, C. R; AGUIAR, J. P. L; AUED-PIMENTEL, S. A. **Pupunha brava (Bactris dahlgreniana) no Estado do Amazonas, Brasil.** Acta Amazonica Venezuelica. 1999. 22 (1): 29-44.

CLEMENT, C. R. **Descriptores mínimos para el pejíbae (Bactris gasipaes H. B. K.) y sus implicaciones filogenéticas.** Costa Rica: Escuela de Biología Universidade de Costa Rica, San José 1986. Dissertação de Mestrado, Costa Rica 1986.

CLEMENT, C. R. **Pupunha: Recursos Genéticos para a produção de palmito.** Horticultura Brasileira v.15 (Suplemento): 186-191.

CLEMENT, C. R; CORADIN, L. (Eds.). Final report (revised): **Peach palm (Bactris gasipaes H. B. K.) germplasm bank.** U. S. A I. D. Project report. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Centro Nacional de Recursos Genéticos, Manaus, Amazonas. 1988. p.78-94.

CLEMENT, C. R. **Pupunha (Bactris gasipaes Kunth, Palmae): Série Frutas Nativas.** Sociedade Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal. 2000.

CLEMENT, C. R. **Pupunha: uma árvore domesticada**. *Ciência Hoje*. 5 (29): 42-49.1985.

CLEMENT, C. R. **Pupunha: Recursos Genéticos, pesquisas realizadas e tecnologias disponíveis**. In: 1º Workshop sobre as culturas de cupuaçu e pupunha da Amazônia, 25-29 March (Claret de Souza, A. G. and Fgueredo dos Santos, A., eds.) CPAA/EMBRAPA, Manaus, AM. 33-49.

CRUZ, C. D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1990. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 1990.

CRUZ, C. D., REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 1994. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, 1994.

DOEBLEY, J. **Molecular evidence & the evolution of maize**. In: **New perspectives on the origin and evolution of New World domesticated plants (Bretting, P.K., ed.)**. *Economic Botany*, 44(3), 1990. Supplement: 6-27.

DOEBLEY, J. **Isomic evidence and the evolution of crops plants**. In: SOLTIS, D. E. e SOLTIS, P. S.; (eds) *Isozymes in plants biology*: Dioscorides Press. Portland, O. R. 1989, p.165-191.

ESQUINAS-ALCAZAR, J. T. **Los recursos filogenéticos, una inversión segura para el futuro**. CIRF/INIA, Madrid, 1982.

EXCOFFIER, L. SMOUSE, P. E. & QUATRO J. M. **Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes application to human mitochondrial DNA restriction data**. *Genetics*. 1992, 137: 479 - 491.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Embrapa-CENARGEN, Brasília. 1998.

FERREIRA, S. A. N. **Maturação fisiológica de sementes de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth)**. Manaus: UFAM/INPA, 1996. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Amazonas/Instituto Nacional de Pesquisas das Amazônia, 1996.

FERREIRA, E. **The phylogeny of pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth, *Palmae*) and allied species**. In: HENDERSON, A: BORCHSENIUS, F. (Ed.) *Evolution*,

variation and classification of palms. New York Botanical Garden Press, 1999, 225 - 236.

FRANKEL, O.H. **Principals and strategies of evaluation.** In: BROWN, A.H.D., Frankel, O.H., Marshall, D.R. and Williams, J.T. **The use of plant genetic resources.** Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1989; 245-260.

HENDERSON, A. **Bactris (Palmae).** *Flora Neotropica, Monograph*, New York Botanical Garden, New York. 2001.

MARTIUS, C. F. P. von. *Guilielma*, In: C.F.P. von Martius, ed. **Historia naturalis palmarum.** T.O. WEIGEL, Leipzig. 1824, 81-83.

MACHADO, C. F. **Procedimentos para a escolha de feijão.** Lavras: UFL, 1999. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, 1999.

MILLER, M. P. **Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA)**, version 1.3. Northern Arizona University. 1997.

MORA URPI, J. WEBER, J. C. & CLEMENT, C. R. **Peach palm (Bactris gasipaes Kunth): Promoting the conservation and use of underutilized and neglected**

crops. Intitute of Plant Genetics and Crop Plant Research - IPK, gatersleben/Internacional Plant genetic Resources Institute. IPG - RI, Rome. . 1997, 83p.

MORA URPI, J. **Diversidad genética en pejibaye. II. Origen y domesticaión.** In: MORA URPI, J.; SZOTT, L. T.; MURILLO, M.; PATIÑO, (V. M. (Eds.). IV Congreso Internacional sobre Biología, Agronomía e Industrialización del Pijuayo. Editorial Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 1993, p. 21-29.

MORA URPI, J. **El pejibaye (B. gasipaes HBK.): origen, biología floral y manejo agronómico.** In: Palmeras poco utilizadas de América Tropical . FAO/CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1994, p.11-19.

NEI, M. **Genetic distance between populations American naturalist.** 1972, 106 949): 283 – 292.

ROHLF, F. J. (1990). NTSYS-p. **Numerical taxonomy and multivariat analysis system**, version. 1.6. Exeter Software, Setauket, NY. 1972.

RAYMOND, M.L.& ROUSSET, R. **An exact test for population differentiation.** **Evolution.** 49, 1995. 1280-1283.

ROJAS-VARGAS, S. RAMIRES, P. MORA URPI, J. **Polimorfismo isoenzimático em cuatro razas y um híbrido de *B. gasipaes*, Palm. Ver Biol. Trop., 1999, 47: 755-761.**

ROHLF, F.J. *NTSYS-p. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version. 1.6.* (1990). Exeter Software, Setauket, NY.

RODRIGUES, D. P. **Análise das morfo-raças primitivas de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) mantidas no banco ativo de germoplasma de pupunha com marcadores moleculares RAPDs.** Brasília: UnB, 2001. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília/UFAM, 2001.

SIMMONDS, N.W. **Principles of crop improvement.** London: Longman, 1979 408p.

SOUSA, N.R; RODRIGUES, D.P; CLEMENT, C.R; NAGAO, E. O; ASTOLFI-FILHO. S. **Discriminação de raças primitivas de pupunha (*Bactris gasipaes*) na Amazônia brasileira por meio de marcadores moleculares (RAPDs).** Acta Amazonica, 2001, 31(4):539-545.

WEIR, B. S. Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, 1996, 445 p.

Apêndice 1 – Identificação das amostras de pupunha utilizadas nas análises RAPD mantidas no Banco Ativo de Germoplasma de Pupunha do INPA.

Nº UFAM	Nº Acesso	Raça	Procedência
P-13	F-0006-78.9	Putumayo	Tabatinga
P-14	F-0007-78.7	Putumayo	Tabatinga
P-18	F-0026-79.	Putumayo	Benjamin Constant
P-38	F-0002-78.4	Putumayo	Tabatinga
P-39	F-0004-78.7	Putumayo	Tabatinga
P-40	F-0048-78.6	Putumayo	Tabatinga
P-41	F-0048-78.5	Putumayo	Tabatinga
P-42	F0048-78.4	Putumayo	Tabatinga
P-43	F-0060-78.5	Putumayo	S ^{to} Antônio do Içá
P44	F-0060-78.6	Putumayo	S ^{to} Antônio do Içá
P-45	F-0051-78.2	Putumayo	Tabatinga
P-46	F-0006-78.1	Putumayo	Tabatinga
P-47	F-0006-78.8	Putumayo	Tabatinga
P-48	F-0048-78.4	Putumayo	Tabatinga
P-49	F-0048-78.7	Putumayo	Tabatinga
S-7	F-0074-79.3	Solimões	Fonte Boa
S-9	F-0081-79.5	Solimões	Fonte Boa
S-16	F-0074-79.4	Solimões	Fonte Boa
S-18	F-0078-79.6	Solimões	Fonte Boa
S-19	F-0079-79.9	Solimões	Fonte Boa
S-20	F-0081-79.8	Solimões	Fonte Boa
S-22	F-0079-79.3	Solimões	Fonte Boa
S-24	F-0070-83.8	Solimões	Fonte Boa
S-28	F-0077-79.6	Solimões	Fonte Boa
S-30	F-0079-79.4	Solimões	Fonte Boa
S-31	F-0081-79.3	Solimões	Fonte Boa
S-33	F-0083-83.2	Solimões	Coari
S-35	F-0064-83.6	Solimões	Fonte Boa
S-36	F-0090-83.6	Solimões	Coari
S-37	F-0083-83.1	Solimões	Coari
Nº UFAM	Nº Acesso	Raça	Procedência
Y103	F-0159-80.2	Pampa Hermosa	Shanusi
Y104	F-0161-80.2	Pampa Hermosa	Shanusi
Y105	F-0161-80.5	Pampa Hermosa	Shanusi
Y106	F-0161-80.9	Pampa Hermosa	Shanusi

Y107	F-0190-80.9	Pampa Hermosa	Shanusi
Y108	F-0192-80.8	Pampa Hermosa	Shanusi
Y109	F-0103-81.5	Pampa Hermosa	Shanusi
Y110	F-0097-81.1	Pampa Hermosa	Shanusi
Y111	F-0097-81.5	Pampa Hermosa	Shanusi
Y112	F-0097-81.8	Pampa Hermosa	Shanusi
Y113	F-0097-81.9	Pampa Hermosa	Shanusi
Y114	F-0100-81.7	Pampa Hermosa	Shanusi
Y115	F-0100-81.8	Pampa Hermosa	Shanusi
Y116	F-0100-81.9	Pampa Hermosa	Shanusi
Y117	F-0101-80.4	Pampa Hermosa	Shanusi
Y118	F-0101-80.6	Pampa Hermosa	Shanusi
Y119	F-0101-80.8	Pampa Hermosa	Shanusi
Y120	F-0155-83.1	Pampa Hermosa	Shanusi
Y121	F-0157-83.4	Pampa Hermosa	Shanusi
Y122	F-0157-83.5	Pampa Hermosa	Shanusi
Y123	F-0158-83.1	Pampa Hermosa	Shanusi
Y124	F-0158-83.2	Pampa Hermosa	Shanusi
Y125	F-0158-83.3	Pampa Hermosa	Shanusi
Y126	F-0160-83.5	Pampa Hermosa	Shanusi
Y127	F-0160-83.3	Pampa Hermosa	Shanusi
Y128	F-0165-83.3	Pampa Hermosa	Shanusi
Y129	F-0165-83.4	Pampa Hermosa	Shanusi
Y130	F-0167-83.3	Pampa Hermosa	Shanusi
Y131	F-0167-83.6	Pampa Hermosa	Shanusi
Y132	F-0167-83.7	Pampa Hermosa	Shanusi
Nº UFAM	Nº Acesso	Raça	Procedência
B-8	50-P.5	Pará	Belém
B-10	60-P.2	Pará	Belém
B-13	19-P.9	Pará	Manaus
B-15	281-P.9	Pará	Rio preto da Eva
B-16	34-P.4	Pará	Rio preto da Eva
B-17	37-P.7	Pará	Rio preto da Eva
B-19	50-P.3	Pará	Belém
B-20	59-P.3	Pará	Belém
B-23	10-P.7	Pará	Rio preto da Eva
B-30	50.P-9	Pará	Belém
B-37	F-0106-83.9	Pará	Gurupá
B-40	F-0102-83.1	Pará	Alenquer

B-41	F-0102-83.4	Pará	Alenquer
B-44	F-0102-83.3	Pará	Alenquer
B-45	F-0101-83.4	Pará	Alenquer
B-49	F-0096-80.8	Pará	Santarém
B-51	F-0100-83.2	Pará	Alenquer
B-52	F-0100-83.3	Pará	Alenquer
B-53	F-0103-83.3	Pará	Alenquer
B-54	F-0103-83.5	Pará	Alenquer
B-55	F-0103-83.7	Pará	Alenquer
B-58	F-0104-83.9	Pará	Alenquer
B-59	F-0105-83.3	Pará	Alenquer
B-60	F-0105-83.1	Pará	Alenquer
B-70	F-0099-83.1	Pará	Alenquer
B-71	F-0099-83.4	Pará	Alenquer
B-72	F-0099-83.6	Pará	Alenquer
B-75	F-0108-83.8	Pará	Gurupá
B-78	F-0109-83.7	Pará	Gurupá
B-79	36-P.1	Pará	Rio preto da Eva
Nº UFAM	Nº Acesso	Raça	Procedência
J-1	F-0189.83-1	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-2	F-0189.83-3	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-3	F-0189.83-5	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-4	F-0199.83-1	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-5	F-0199.83-4	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-6	F-0199.83-8	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-7	F-0200.83-5	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-8	F-0200.83-7	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-9	F-0201.83-2	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-10	F-0201.83-4	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-11	F-0201.83-6	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-12	F-0201.83-7	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-13	F-0189.83-2	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-14	F-0189.83-4	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-15	F-0189.83-6	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-16	F-0189.83-9	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-17	F-0199.83-2	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-18	F-0199.83-3	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-19	F-0199.83-5	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-20	F-0199.83-6	Juruá	Cruzeiro do Sul

J-21	F-0199.83-7	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-22	F-0200.83-1	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-23	F-0200.83-2	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-24	F-0200.83-3	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-25	F-0200.83-4	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-26	F-0200.83-6	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-27	F-0200.83-8	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-28	F-0201.83-1	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-29	F-0201.83-3	Juruá	Cruzeiro do Sul
J-30	F-0201.83-8	Juruá	Cruzeiro do Sul
Nº UFAM	Nº Acesso	Raça	Procedência
U-2	F-0138-80.9	Útilis	San Isidro del General
U-8	F-0148-80.7	Útilis	San Isidro del General
U-9	F-0146-80.5	Útilis	San Isidro del General
U-10	F-0145-80.4	Útilis	San Isidro del General
U-11	F-0138-80.2	Útilis	San Isidro del General
U-13	F-0146-80.4	Útilis	San Isidro del General
U-15	F-0138-80.6	Útilis	San Isidro del General
U-16	F-0148-80.6	Útilis	San Isidro del General
U-17	F-0146-80.1	Útilis	San Isidro del General
U-18	F-0140.80.8	Útilis	San Isidro del General
D-31	F-0202-80.8	Darien	Cuenca del canal
D-32	F-0200-80.2	Darien	Cuenca del canal
D-33	F-0199-80.6	Darien	Cuenca del canal
D-34	F-0200-80.1	Darien	Cuenca del canal
D-35	F-0200-80.9	Darien	Cuenca del canal
D-36	F-0202-80.6	Darien	Cuenca del canal
D-37	F-0202-80.7	Darien	Cuenca del canal
D-38	F-0200-80.4	Darien	Cuenca del canal
D-39	F-0200-80.6	Darien	Cuenca del canal
D-40	F-0200-80.7	Darien	Cuenca del canal
G-28	L-7M-94.1	Guatuso	Costa Rica
G-29	L-7M-94.2	Guatuso	Costa Rica
G-30	L-7M-94.5	Guatuso	Costa Rica
G-31	L-3M-94.2	Guatuso	Costa Rica
G-32	L-3M-94.9	Guatuso	Costa Rica
G-33	L-4-94.3	Guatuso	Costa Rica
G-34	L-4-94.7	Guatuso	Costa Rica
G-35	L-6M-94.2	Guatuso	Costa Rica

G-36	L-5M-94.4	Guatuso	Costa Rica
G-37	L-5M-94.8	Guatuso	Costa Rica
Nº UFAM	Nº Acesso	Raça	Procedência
V-1	F-0211-84.3	Vaupés	Rio Vaupés
V-2	F-0211-84.5	Vaupés	Rio Vaupés
V-3	F-0211-84.7	Vaupés	Rio Vaupés
V-4	F-0211-84.4	Vaupés	Rio Vaupés
V-5	F-0215-84.1	Vaupés	Rio Vaupés
V-6	F-0215-84.5	Vaupés	Rio Vaupés
V-7	F-0215-84.8	Vaupés	Rio Vaupés
V-8	F-0209-84.2	Vaupés	Rio Vaupés
V-9	F-0209-84.2	Vaupés	Rio Vaupés
V-10	F-0209-84.3	Vaupés	Rio Vaupés
V-11	F-0209-84.4	Vaupés	Rio Vaupés
V-12	F-0209-84.5	Vaupés	Rio Vaupés
V-13	F-0209-84.7	Vaupés	Rio Vaupés
V-14	F-0211-84.1	Vaupés	Rio Vaupés
V-15	F-0164-84.6	Vaupés	Rio Vaupés
Nº UFAM	N-º Acesso	Raça	Procedência
C-1	F-0004-79.6	Cauca	Bajo Calima
C-2	F-0005-79.2	Cauca	Buenaventura
C-3	F-0005-79.5	Cauca	Buenaventura
C-4	F-0005-79.9	Cauca	Buenaventura
C-5	F-0006-79.2	Cauca	Buenaventura
C-6	F-0004-79.3	Cauca	Bajo Calima
C-7	F-0004-79.7	Cauca	Bajo Calima
C-8	F-0006-79.3	Cauca	Buenaventura
C-9	F-0005-79.1	Cauca	Buenaventura
C-10	F-0006-79.2	Cauca	Buenaventura
C-11	F-0005-79.8	Cauca	Buenaventura
Nº UFAM	Nº Acesso	Raça	Procedência
I-1	F-0217-84.3	Inirida	Rio Inirida
I-2	F-0217-84.9	Inirida	Rio Inirida
I-3	F-0217-84.2	Inirida	Rio Inirida
I-4	F-0217-84.5	Inirida	Rio Inirida
I-5	F-0217-84.8	Inirida	Rio Inirida
I-6	F-0217-84.1	Inirida	Rio Inirida
Nº UFAM	Nº Acesso	Raça	Procedência
Col-1	INPA	<i>B. gasipaes</i> var. <i>chichagui</i>	Rio Magdalena

Col-2	INPA	<i>B. gasipaes</i> var. <i>chichagui</i>	Rio Magdalena
Col-3	INPA	<i>B. gasipaes</i> var. <i>chichagui</i>	Rio Magdalena
Col-4	INPA	<i>B. gasipaes</i> var. <i>chichagui</i>	Rio Magdalena
Col-5	INPA	<i>B. gasipaes</i> var. <i>chichagui</i>	Rio Magdalena
RX-1	INPA	<i>B. gasipaes</i> var. <i>chichagui</i>	Rio Xingu
RX-2	INPA	<i>B. gasipaes</i> var. <i>chichagui</i>	Rio Xingu
RX-3	INPA	<i>B. gasipaes</i> var. <i>chichagui</i>	Rio Xingu
RX-4	INPA	<i>B. gasipaes</i> var. <i>chichagui</i>	Rio Xingu
RX-5	INPA	<i>B. gasipaes</i> var. <i>chichagui</i>	Rio Xingu
RX-6	INPA	<i>B. gasipaes</i> var. <i>chichagui</i>	Rio Xingu
RX-7	INPA	<i>B. gasipaes</i> var. <i>chichagui</i>	Rio Xingu
RX-8	INPA	<i>B. gasipaes</i> var. <i>chichagui</i>	Rio Xingu
RX-9	INPA	<i>B. gasipaes</i> var. <i>chichagui</i>	Rio Xingu
RX-10	INPA	<i>B. gasipaes</i> var. <i>chichagui</i>	Rio Xingu
RX-11	INPA	<i>B. gasipaes</i> var. <i>chichagui</i>	Rio Xingu
RX-12	INPA	<i>B. gasipaes</i> var. <i>chichagui</i>	Rio Xingu
RX-13	INPA	<i>B. gasipaes</i> var. <i>chichagui</i>	Rio Xingu

Apêndice 2 - Perfil eletroforético obtido com o iniciador OPA-4, a partir do DNA de oito raças de pupunha (M = 1 Kb ladder (Gibco); c = controle).

