



NATÁLIA PADILHA DE OLIVEIRA

DIVERSIDADE GENÉTICA E CITOGENÉTICA
EM *Astrocaryum* SPP. (ARECACEAE)

LAVRAS-MG

2016

NATÁLIA PADILHA DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E CITOGENÉTICA EM *Astrocaryum*
SPP. (ARECACEAE)**

Tese de doutorado apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de doutor.

Prof. Dra. Lisete Chamma Davide

Orientadora

Dra. Susan Kalisz

Co-orientadora

LAVRAS – MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da
Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a)
autor(a).**

Oliveira, Natália Padilha de.

Diversidade Genética e Citogenética em *Astrocaryum*
spp. (Arecaceae) / Natália Padilha de Oliveira. - 2016.
105 p.

Orientador(a): Lisete Chamma Davide.

Coorientador(a): Susan Kalisz

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2016.

Bibliografia.

1. Genética molecular. 2. Citogenética. 3. Palmeiras. I.
Davide, Lisete Chamma. II. Kalisz, Susan . III. Título.

NATÁLIA PADILHA DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E CITOGENÉTICA EM *Astrocaryum*
SPP. (ARECACEAE)**

Tese de doutorado apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de doutor.

APROVADA em 16 de setembro de 2016.

Dra. Elisa Ferreira Moura Cunha EMBRAPA-CPATU

Profa.Dra. Dulcinéia de Carvalho UFLA

Dr. Welison Andrade Pereira UFLA

Profa. Dra. Vânia Helena Techio UFLA

Profa. Dra. Lisete Chamma Davide

Orientadora

LAVRAS – MG

2016

Aos meus amados avós Joaquim Padilha (in memoriam) e Ana Maria Padilha (in memoriam) pelo amor, carinho e tantos mimos recebidos... Fizeram-se presentes em todas as etapas da minha vida, torcendo para alcançar meus objetivos e comemorando minhas conquistas como se fossem suas.

OFEREÇO

Aos meus pais, Enéas e Socorro, pelo apoio incondicional, por sempre acreditarem em mim, mesmo em momentos que duvidei que era capaz, e por terem feito dos meus sonhos, os seus.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, que esteve sempre do meu lado, independente da distância física, sem medir esforços para me ajudar. Obrigada por ser esse pai amigo e dedicado, por torcer pelo meu sucesso, por compartilhar momentos de tristeza e alegria e por acreditar de uma forma em mim, que muitas vezes nem eu acredito.

À minha mãe, que continuar a ser meu espelho profissional. Sua dedicação vai além dos papéis familiares. Obrigada pelo incentivo, pelos valiosos ensinamentos, por compartilhar alegrias e desapontamentos científicos, por ter estado ao meu lado ao longo dessa jornada e por sempre acreditar na minha capacidade.

Ao meu filhote de quatro patas, Dado, que foi meu grande companheiro ao longo desses quatro anos, e de quem eu recebo muito carinho sempre que chego em casa, mesmo quando passo o dia fora.

À professora Lisete, com quem muito aprendi durante esses anos e a quem devo a orientação dessa tese. Obrigada por ter sido um pouco minha mãe nos momentos em que precisei e pela confiança em mim depositada.

Às professoras Vânia e Giovana pelo apoio prestado ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Luis Gustavo, da Universidade Federal de Pernambuco, pelas valiosas dicas que ajudaram na obtenção de metáfases tão bonitas.

Aos laboratoristas Felipe Correa e Iara Silva, pela ajuda sempre que solicitada, facilitando nosso trabalho cotidiano.

Aos meus amigos, Rodrigo e Emilyn, pelos conhecimentos compartilhados, e que mesmo distantes e diante da correria que a vida

acadêmica nos impõe, se fizeram presente dividindo momentos de tristeza, desespero e alegria, e torceram por minha conquista.

Ao meu amigo Davi pelo companheirismo, paciência em me ensinar estatística e pelas inúmeras ajudas prestadas durante a realização desse trabalho.

Aos colegas de laboratório pelo apoio, companhia, e agradável ambiente de trabalho. Em especial, às queridas Laiane e Raquel com as quais eu dividi alegrias, conquistas, desesperos e inúmeros dias divertidos preparando soluções! Obrigada pela grande ajuda na finalização deste trabalho.

À Yasmim, pelo auxílio no desenvolvimento da parte experimental deste trabalho.

Aos assistentes de pesquisa do Laboratório de Fitomelhoramento da Embrapa Amazônia Oriental, Antônio Teixeira Costa, Joel Pinheiro da Silva, Raimundo Costa de Souza e Euclides da Rosa Ribeiro pelo apoio infundável na coleta e envio das amostras.

À Embrapa Amazônia Oriental e Embrapa Amapá pela permissão da coleta e envio das amostras dos bancos de germoplasma de espécies de *Astrocaryum*.

Aos professores do programa de Genética e Melhoramento de Plantas pelos ensinamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade Federal de Lavras - UFPA pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Pesquisas – CNPq e À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior – CAPES pela concessão de bolsa ao longo desses quatro anos.

Muito obrigada!

"Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a
eletricidade e a energia atômica: a vontade"

Albert Einstein

Resumo

O gênero *Astrocaryum* é composto por 40 espécies, a maioria de grande utilidade pela população amazônica, sendo que algumas apresentam grande potencial para a economia brasileira. No entanto, até o momento não há informações acerca da diversidade genética e características citogenéticas destas espécies. O objetivo deste trabalho foi quantificar a diversidade genética de três espécies de *Astrocaryum*, e caracterizar e comparar o tipo de núcleo interfásico, morfologia cariotípica, padrão de bandeamento e hibridização *in situ* de quatro *Astrocaryum* spp. Para as análises de diversidade, o material foi coletado em três municípios para *A. aculeatum*: Belterra, Santarém e Terra Santa; e em dois para *A. murumuru* – Belém e Santo Antônio do Tauá – e *A. paramaca* – Belém e Ananindeua, todos pertencentes ao estado do Pará, Brasil. Treze locus microssatélites foram testados em multiplexes, dos quais oito amplificaram bem e foram usados nas análises genéticas. Para o estudo citogenético, foram feitas as análises do núcleo interfásico, bandeamento cromossômico e hibridização *in situ* de sequências 45S e 5S de rDNA, e sequência telomérica. O número médio de alelos por loco para *A. aculeatum*, *A. murumuru* e *A. paramaca* foi de 2,33, 2,38 e 2,06, respectivamente. A diversidade genética (H_e) variou de 0,222 para *A. aculeatum* a 0,254 em *A. murumuru*. Ambos F_{ST} e AMOVA mostraram que maior parte da diversidade genética encontra-se localizada dentro das populações, mas alta diferenciação genética foi observada entre populações de *A. aculeatum*. Três locos (Aac 04, Aac06 and Aac12) não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg nas três espécies, com tendência de excesso de heterozigotos em populações de *A. paramaca* ($F_{IS} = -0,144$). O fluxo gênico foi alto nas populações de *A. paramaca* ($Nm = 19,35$). Os dados cariotípicos são inéditos. As quatro espécies apresentaram $2n = 30$ cromossomos, mas diferenças nas fórmulas cariotípicas, número e posição de bandas CMA⁺ e sítios 45S, e posição de sítios 5S foram observadas. Houve diferença significativa para o comprimento total do lote haploide, com variação de 43% entre o menor (*A. paramaca* – 27,085 μm) e o maior valor encontrado (*A. murumuru* – 47,486 μm). Nossos resultados sugerem que o nível de diversidade genética entre as espécies é similar e a maior parte dessa diversidade é encontrada dentro das populações para as três espécies investigadas. Os dados cariológicos obtidos permitem a identificação de espécies classificadas em diferentes subgêneros.

Palavras-chave: Diversidade genética, Fluxo gênico, Cariograma, Bandeamento cromossômico, FISH.

Abstract

The *Astrocaryum* genus comprises 40 species, most widely used by the Amazon population, some with great potential to the Brazilian economy. However, to date there is no information on the genetic diversity and cytogenetic characteristics of these species. This work aimed assessing the level and distribution of genetic diversity in three *Astrocaryum* species and to characterize and compare the type of interphase nuclei, chromosome set for morphology, fluorochrome banding and *in situ* hybridization of four *Astrocaryum* spp. For genetic diversity analyses, plant material was sampled in three municipalities for *A. aculeatum*: Belterra, Santarém and Terra Santa; and two for both *A. murumuru*: Belém and Santo Antônio do Tauá; and *A. paramaca*: Belém and Ananindeua, all in Pará state, Brazil. Thirteen microsatellite loci were tested in multiplex sets, of which eight amplified well and were used for genetic analysis. For cytogenetic study, analyses consisting of interphase nucleus, fluorochrome staining, and *in situ* hybridization using 45S and 5S rDNA probes, and telomere sequence were carried out. Mean number of alleles per locus for *A. aculeatum*, *A. murumuru* and *A. paramaca* were 2.33, 2.38 and 2.06, respectively. Genetic diversity (H_e) varied from 0.222 in *A. aculeatum* to 0.254 in *A. murumuru*. Both F_{ST} and AMOVA showed most of the genetic variation is found within populations for the three species, but high genetic differentiation among populations were found for *A. aculeatum*. Loci Aac04, Aac06 and Aac12 were not in Hardy-Weinberg equilibrium for the three species, with populations of *A. paramaca* showing a tendency for excess of heterozygotes ($F_{IS} = -0.144$). Gene flow was high for populations of *A. paramaca* ($Nm = 19.35$). Karyological data for all species were first relate. Species showed $2n = 30$ chromosomes, but differences in the karyotypic formula, number and position of CMA⁺ bands and 45S sites, and position of 5S rDNA sites were observed. There was significant difference for total length of haploid set, with a 43% difference between the smallest (*A. paramaca* – 27.085 μm) and the highest (*A. murumuru* – 47.486 μm). Our results suggest that levels of genetic diversity are similar among species and most of the genetic diversity is found within populations for the species evaluated. Karyological data allowed us to recognize species belonging to different subgenera of *Astrocaryum*.

Key words: Genetic diversity, Gene flow, Karyogram, Chromosome banding, FISH.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1. Taxonomia do gênero <i>Astrocaryum</i> G. Mey.....	15
2.2. Aspectos botânicos das espécies de <i>Astrocaryum</i> G. Mey.	18
2.3. Importância sócio-econômica, uso e potencial de espécies de <i>Astrocaryum</i>	22
2.4. Diversidade genética e os marcadores moleculares	25
2.4.1. Estudos de diversidade genética em espécies de palmeiras	26
2.5. Estudos citogenéticos na família <i>Arecaceae</i>.....	30
2.5.1. Número cromossômico	31
2.5.2. Características do núcleo interfásico e padrão de bandejamento	34
2.5.3. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	37
3 REFERÊNCIAS.....	40
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	
Artigo 1 - Population genetic structure of three species in the genus <i>Astrocaryum</i> G. Mey. (<i>Arecaceae</i>).....	50
INTRODUCTION	52
MATERIAL AND METHODS	54
RESULTS	61
DISCUSSION.....	71
CONCLUSIONS	75
REFERENCES.....	76
Artigo 2 - Karyological differentiation of four species of <i>Astrocaryum</i> G. Mey. (<i>Arecaceae</i>).....	81
INTRODUCTION	83
MATERIAL AND METHODS	85
RESULTS	88
DISCUSSION.....	98

CONCLUSIONS	102
REFERENCES.....	102

1 INTRODUÇÃO

A abundância de espécies de palmeiras no território brasileiro é notória, sendo amplamente distribuídas em 39 gêneros e 264 espécies, as quais ocorrem em todos os ecossistemas nacionais (SOUZA E LORENZI, 2005; SCARIOT, 2015). As palmeiras pertencem à família Arecaceae, considerada uma das famílias vegetais mais úteis para a humanidade devido à grande importância apresentada para as comunidades que as utilizam, fornecendo alimentos nas mais variadas formas, além de madeira, fibras, e outros subprodutos (CLEMENT *et al.*, 2005; SCARIOT, 2015). Essas espécies também possuem uma relação íntima com a fauna e flora da região onde ocorrem, constituindo componente essencial na dieta de diversas espécies de aves, mamíferos, peixes e insetos (LLERAS *et al.*, 1983; VILLACHICA, 1996).

Em contraste com essa importância, poucas espécies dessa família têm seu potencial econômico explorado, fato este refletido no baixo número de espécies domesticadas (LLERAS *et al.*, 1983; SCARIOT, 2015). Dentro deste panorama pode-se citar o gênero *Astrocaryum* G. Mey, que é composto por cerca de 40 espécies (KAHN, 2008), das quais pelo menos *A. aculeatum* G. Mey, *A. murumuru* Mart. e *A. vulgare* Mart. são apontadas como espécies com potencial econômico e promissoras para produção de agrocombustíveis (CLEMENT *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2007; SCARIOT, 2015). Apesar desse potencial, suas produções ainda são provenientes da exploração extrativista.

Todas as partes das plantas são utilizadas, sendo os frutos empregados na obtenção de alimentos e óleo, as sementes utilizadas no artesanato regional, as folhas na obtenção de fibras e o estipe utilizado na construção (KAHN, 2008; CLEMENT *et al.*, 2005; SCARIOT, 2015). Devido ao potencial e à importância

apresentada por essas espécies, especialmente em um contexto regional, estudos que venham a contribuir para o conhecimento, manejo e uso sustentável desses recursos genéticos e, conseqüentemente, com a domesticação dos mesmos são de grande valia, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de programas de conservação, melhoramento genético, além de contribuírem para o incremento da agricultura regional.

O estudo do nível e estrutura da diversidade genética em populações naturais é crucial no planejamento de estratégias de conservação e manejo (LOVELESS e HAMICK, 1984), permitindo uma utilização adequada do recurso genético, evitando a extinção da espécie, sendo importante objeto de pesquisas básicas e aplicadas (MONDINI *et al.*, 2009). Há vasta literatura abordando espécies de palmeiras, com maior enfoque no nível de diversidade genética (porcentagem de locos polimórficos, número médio de alelos por loco e heterozigosidade) e como essa diversidade encontra-se estruturada entre e dentro de populações (REIS *et al.*, 2000; CONTE *et al.*, 2003; MEEROW *et al.*, 2003; SREEKUMAR e RENUKA, 2006; BUTTOW *et al.*, 2010; CHOO *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2011). Outros parâmetros, tais como os coeficientes de endogamia de Wright e fluxo gênico, ainda são pouco abordados (SHAPCOTT, 1998, 1999; ELSHIBLI e KORPELAINEN, 2008; MARTINS-CORDER *et al.*, 2009; SHAPCOTT *et al.*, 2009; NAMOFF *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011; GIOVINO *et al.*, 2014; NAZARENO e REIS, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014; MOURA *et al.*, 2015).

A caracterização citogenética também é uma atividade importante a ser realizada, uma vez que as metodologias disponíveis nessa área auxiliam no entendimento da evolução de espécies, fornecem importantes dados para

taxonomia e estudos de conservação, e auxiliando a montagem de mapas físicos e programas de melhoramento (BARELLA e KARSBURG, 2007; KARSBURG e BATTISTIN, 2006; MORAES, 2007; STACE, 2000). Tais estudos envolvendo espécies de palmeiras têm se tornado mais frequentes nas últimas décadas (READ, 1965, 1966; ANUNCIÇÃO FILHO, 1986; RÖSER, 1993, 1994, 1995, 2000; RÖSER *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2008a; OLIVEIRA *et al.*, 2008b; CORRÊA *et al.*, 2009; OLIVEIRA, 2011; ABREU *et al.*, 2011; GAIERO *et al.*, 2012; OLIVEIRA, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2016). Röser (1994), em um dos trabalhos mais significativos de citogenética de espécies da família Arecaceae, apresenta dados cariológicos para 56 taxa, abrangendo as seis subfamílias, que incluem informações a respeito da estrutura dos núcleos interfásicos, do número cromossômico, além de ter realizado estudos acerca de regiões específicas do DNA, estabelecendo e comparando padrões de bandas CMA, DAPI, C, NOR para alguns destes taxa. No entanto, não há informação alguma na literatura para a maioria das espécies do gênero *Astrocaryum*, tendo sido relatado apenas o número cromossômico ($2n = 30$) para *A. vulgare* (OLIVEIRA *et al.*, 2008a).

Nas unidades da Embrapa Amazônia Oriental e Embrapa Amapá há bancos ativos de germoplasma contendo representantes das três espécies de *Astrocaryum* abordadas nesse trabalho. O BAG-tucumã, sediado na Embrapa Amazônia Oriental, foi originado na década de 1980 após coletada realizada em populações naturais de *Astrocaryum vulgare* em alguns municípios do estado do Pará. Coletas mais recentes foram realizadas para enriquecimento desse BAG, que agora encontra-se composto por outras espécies desse gênero (OLIVEIRA *et al.*, 2015). De acordo com Valls (1988), atividades de caracterização, como informações a respeito da variabilidade genética e características citogenéticas

das espécies, valorizam os acessos de bancos de germoplasma e permitem o uso mais seguro dos acessos para fins de pesquisa.

Com base no exposto, o objetivo deste trabalho foi contribuir com informações acerca dos níveis e distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações, e sobre características citogenéticas de algumas espécies do gênero *Astrocaryum*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Taxonomia do gênero *Astrocaryum* G. Mey.

De acordo com a classificação de Cronquist (1981), o gênero *Astrocaryum* pertence ao filo Magnoliophyta, classe Liliopsida, ordem Arecales, família Arecaceae e subfamília *Arecoideae*.

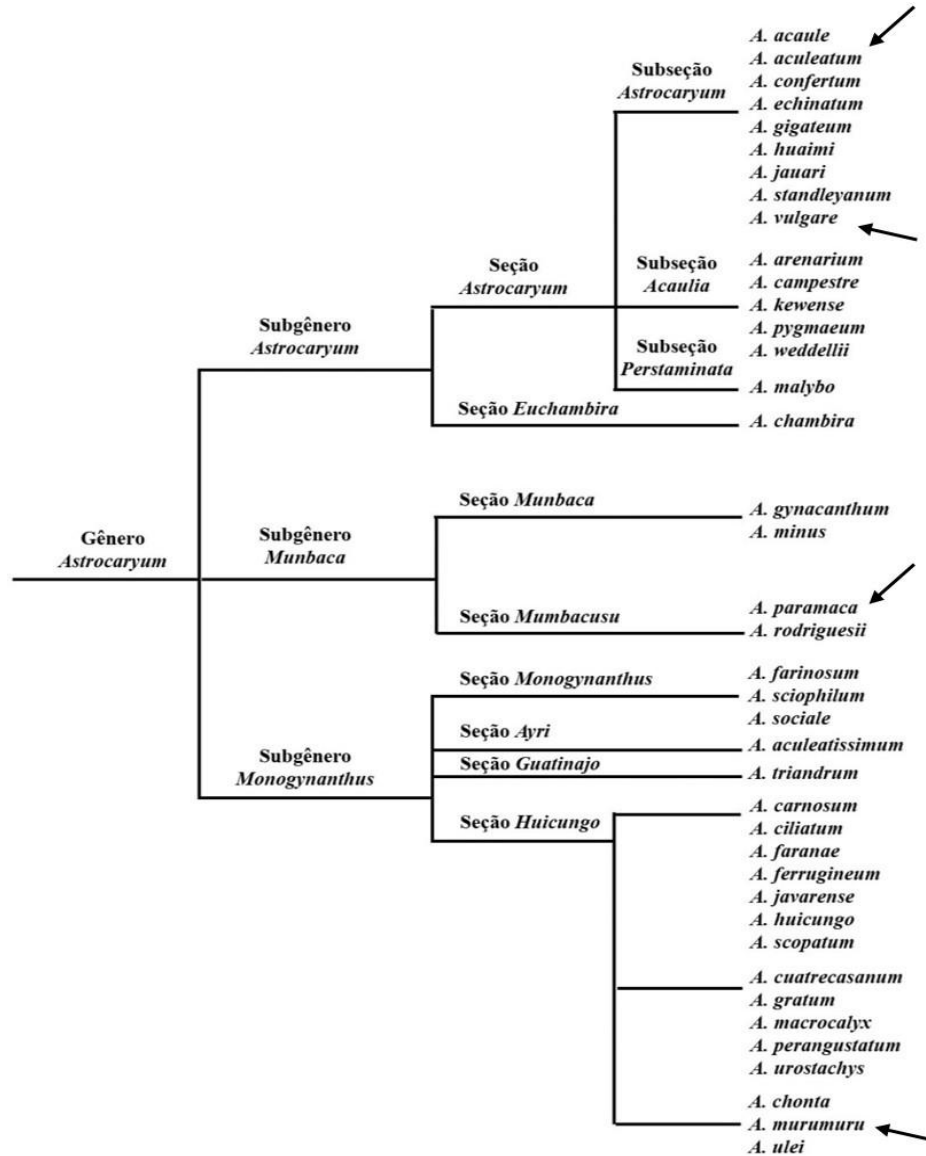
O gênero *Astrocaryum* tem passado por muitas mudanças taxonômicas. Conforme Kahn (2008), características morfológicas, como as flores e frutos, constituem as principais informações levadas em consideração na classificação desse grupo. Dentro desse contexto, o autor relata que, primeiramente, Martius dividiu este gênero em dois subgêneros, *Acaulia* e *Caudescentia*, separando as espécies deste último de acordo com o número e distribuição de flores pistiladas ao longo das ráquulas na inflorescência. Esse autor também comentou que Drude propôs a separação das espécies em quatro seções, *Munbaca*, *Ayri*, *Tucuma* e *Malybo*, de acordo com características do fruto, mas criticou essa última seção por incluir *Bactris humilis* com duas espécies do gênero *Astrocaryum*. Ainda de

acordo com Kahn (2008), anos depois, Drude sugeriu a separação das espécies em dois subgêneros *Munbaca* e *Tucuma*.

Segundo Kahn (2008), o número de flores pistiladas na base da ráquila também foi usado com o objetivo de separar adequadamente as espécies de *Astrocaryum*, pelo sistemata Burret, que propôs dois subgêneros: *Pleigynanthus* com duas ou mais flores pistiladas por ráquulas e *Monogynanthus* com apenas uma flor. No entanto, como também ocorreu para as outras sugestões, essa separação apresentava alguma inconsistência, como o reconhecimento de uma das subseções, *Hexodon*, como sendo sinonímia de outro gênero, *Hexopetion* (Kahn, 2008).

Ainda de acordo com Kahn (2008), o sistema mais eficiente na classificação das espécies de *Astrocaryum* foi proposto por Barbosa Rodrigues em 1903, utilizando as características do fruto. Kahn (2008) elevou os três grupos propostos por Rodrigues ao nível de subgênero e sugeriu o seguinte sistema de classificação: subgênero *Astrocaryum* G. Mey, com duas seções; subgênero *Munbaca* Drude, com duas seções; e o subgênero *Monogynanthus* Burret, com quatro seções. As espécies *A. aculeatum* e *A. vulgare* pertencem ao subgênero *Astrocaryum*, seção *Astrocaryum* e subseção *Astrocaryum*. A espécie *A. paramaca* está classificada no subgênero *Munbaca* Drude e subseção *Munbacusu* (Barb. Rodr.) F. Kahn. A espécie *A. murumuru* está inserida no subgênero *Monogynanthus*, seção *Huicungo* F. Kahn e subseção *Murumuru* Barb. Rodr. (Figura 1).

Figura 1. Esquema da chave taxonômica do gênero *Astrocaryum* de acordo com a classificação de Kahn (2008). As setas destacam as espécies utilizadas nesse trabalho. Fonte: Do autor (2016).



Outra questão muito divergente entre as literaturas diz respeito ao número de espécies que representam este gênero, incluindo a nomenclatura das espécies reconhecidas (KAHN, 2008; THE PLANT LIST WEBSITE, 2016). De acordo com o website The plant list (2016), são reconhecidas 38 espécies distribuídas em vários países do continente americano. Kahn (2008), por sua vez, apresenta uma taxonomia mais detalhada a respeito desse grupo, na qual são reconhecidas 40 espécies distribuídas por doze países, estando bem representadas no Brasil, Colômbia, Peru, Guianas e Suriname.

No Brasil o número de espécies reconhecidas também é contrastante de uma literatura para outra. Segundo Leitman *et al.* (2013), ocorrem 21 espécies sendo cinco endêmicas. De acordo com Kahn (2008), são 26, sendo oito endêmicas. Somente *A. murumuru* possui três variedades, *A. murumuru* var. *ciliatum* A. J. Hend, *A. murumuru* var. *ferrugineum* A. J. Hend e *A. murumuru* Mart. var. *murumuru* (LEITMAN *et al.*, 2013).

2.2. Aspectos botânicos das espécies de *Astrocaryum* G. Mey.

Ao que tudo indica as palmeiras do gênero *Astrocaryum* são originárias do continente Americano, sendo as espécies *A. aculeatum* G. Mey, *A. murumuru* Mart., *A. paramaca* Mart. e *A. vulgare* Mart. apontadas como nativas da região Amazônica (LLERAS *et al.*, 1983; SOUZA *et al.*, 1996; LEITMAN *et al.*, 2013).

De forma geral, as espécies de *Astrocaryum* ocorrem ao longo de ecossistemas tropicais da América do Sul e América Central. Por adaptarem-se bem à abertas e que já sofreram alterações antrópicas, podem ser encontradas em

vários tipos de ambiente, desde formações florestais densas até regiões de savana (KAHN, 2008; FAO, 1987). Segundo Costa (2000), pelo fato de *A. aculeatum*, conhecida como tucumã do Amazonas, tolerar solos pobres e áreas desmatadas, pode ser integrado em sistemas agroflorestais.

Segundo Kahn e Millán (1992) as palmeiras desse gênero são facilmente identificadas devido às fortes características que apresenta. No entanto, ainda de acordo com esses mesmos autores, o reconhecimento em nível de espécie se torna mais difícil devido a ampla variação morfológica existente, além do fato de abranger uma grande quantidade de espécies, sendo reconhecido como o terceiro gênero mais diverso na região da Amazônia, perdendo apenas para os gêneros *Geonoma* e *Bactris*.

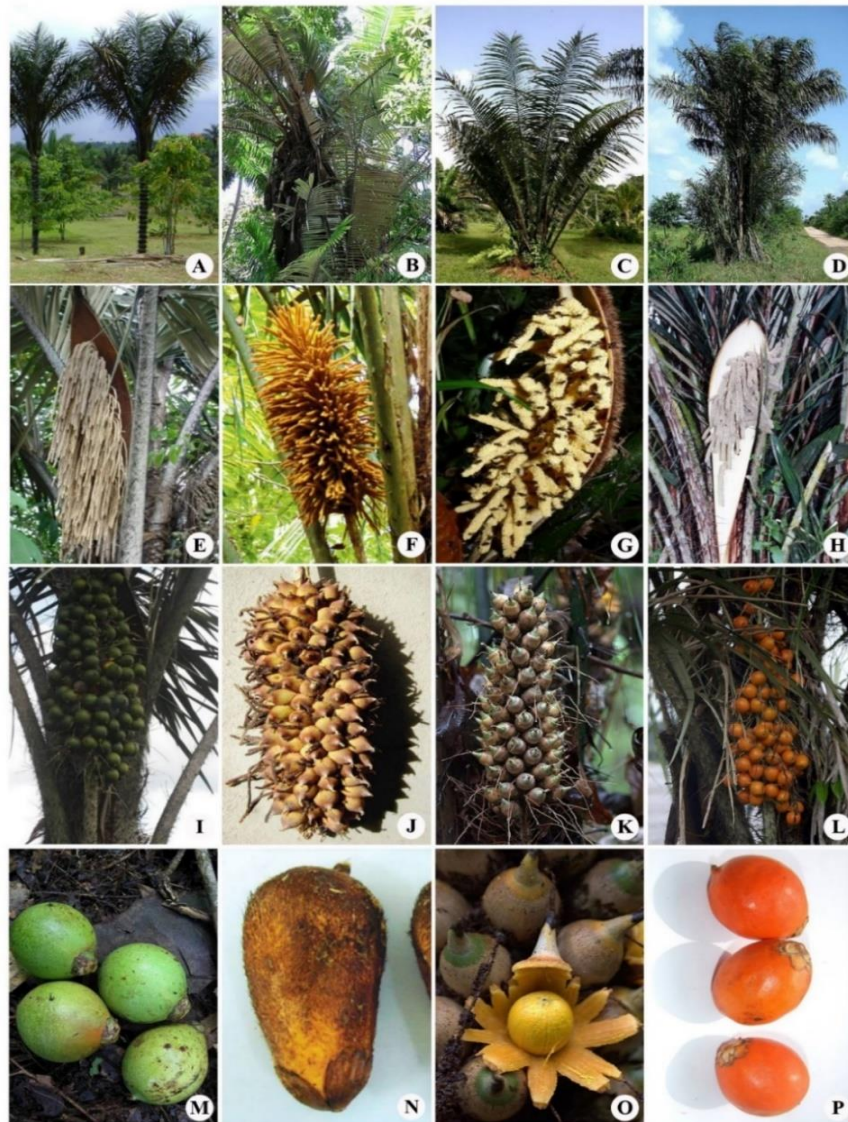
As espécies de *Astrocaryum* são perenes, monoicas e apresentam como característica marcante a presença de espinhos ao longo de toda a planta (estipe, folhas, inflorescências e em algumas nos frutos) (Figura 2), sendo esta uma das razões que dificulta a colheita e limita o interesse pelo cultivo dessas espécies (KAHN, 2008; ROCHA e POTIGUARA, 2007). Estas espécies possuem ampla variação morfológica para o tamanho do caule, variando de espécies que apresentam caules aéreos de tamanho variável até espécies acaules, que quase se escondem entre a vegetação arbustiva (LORENZI *et al.*, 2004; KAHN, 2008). Há variação também para o tipo de estipe (Figura 2), com espécies monocaules (solitárias) e multicaules, estas últimas formando touceiras (HENDERSON *et al.*, 1995; KAHN, 2008); para o formato do fruto, desde elipsoide a oval, e para a coloração do fruto e de sua polpa, a variação vai de verde até fortemente alaranjado (LORENZI *et al.*, 2004; KAHN, 2008). O endocarpo pode ser exposto quando maduro em espécies cujos frutos são deiscentes, como acontece

em *A. rodriguesii* (KAHN, 2008). As palmeiras desse gênero apresentam folhas do tipo pinadas e o plano de distribuição ao longo do estipe varia dentre as espécies, desde regularmente distribuídas em um único plano a irregularmente distribuídas em planos diferentes (LORENZI *et al.*, 2004).

As inflorescências são interfolias (Figura 2), com ramos florais dispostos em uma raque de tamanho variável, nos quais as flores encontram-se formando tríades (uma flor pistilada ladeada por flores estaminadas) na porção proximal, sendo que na porção distal são encontradas apenas flores estaminadas (LORENZI *et al.*, 2004; KAHN, 2008). O período de floração e frutificação é variável conforme a espécie e o ambiente em que ocorre. *A. aculeatum* tem seu período de florescimento relatado para intervalo entre os meses de junho a janeiro, frutificando entre fevereiro e agosto; *A. murumuru*, por sua vez, floresce entre fevereiro e abril, com frutificação entre os meses de abril e junho; e *A. vulgare* floresce de março a junho e frutifica no período de novembro a abril (RIBEIRO *et al.*, 1999; SHANLEY e MEDINA, 2005).

A propagação dessas palmeiras é realizada predominantemente por meio das sementes, com possibilidade para a propagação vegetativa das espécies que perfilham, como é o caso de *A. aculeatissimum* (PORTELA e SANTOS, 2011). Das três espécies alvo desse trabalho, apenas *A. aculeatum* apresenta o tipo monocaule, sendo complicada e talvez impossível sua propagação vegetativa (RAMOS, 2008).

Figura 2. Representação das principais características morfológicas das espécies de *Astrocaryum* estudadas. Visão geral da planta, inflorescência, infrutescência e fruto – A, E, I e M: *A. aculeatum*; B, F, J, N: *A. murumuru*; C, G, K, O: *A. paramaca*; D, H, L, P: *A. vulgare* – respectivamente. Fonte: Google images.



As sementes, de forma geral, apresentam dificuldade para germinar, devido à ocorrência de forte dormência e emergência lenta das plântulas, outro fator apontado por Ferreira e Gentil (2006) como razão para o inexpressivo cultivo de *A. aculeatum* na região amazônica, característica esta presente também em *A. vulgare* (OLIVEIRA *et al.*, 2015) e que pode ser extrapolada para *A. murumuru* e *A. paramaca*. Nessas espécies, o período para germinação pode levar anos (SHANLEY e MEDINA, 2005). Ferreira e Gentil (2006) desenvolveram um protocolo que envolve a remoção do endocarpo e a embebição em água por quinze dias para a redução da dormência e obtiveram maior rapidez na germinação de *A. aculeatum*.

2.3. Importância sócio-econômica, uso e potencial de espécies de *Astrocaryum*

As palmeiras do gênero *Astrocaryum* apresentam grande versatilidade quanto ao seu uso, sendo todas as partes da planta consideradas utilizáveis, de forma que fornecem inúmeros produtos ao povo da região de ocorrência (KAHN, 2008; SCARIOT, 2015). As espécies *A. aculeatum*, *A. murumuru* e *A. vulgare*, em especial, representam importantes recursos vegetais na região amazônica, sendo empregadas de várias formas pela população local (CAVALCANTE, 1991; KAHN, 2008). Na literatura faltam informações a respeito da espécie *A. paramaca*.

Os frutos são bem apreciados na culinária regional podendo ser consumidos na forma *in natura*, bem como se pode extrair a polpa para fazer sucos, doces e sorvetes (CLEMENT *et al.*, 2005; SHANLEY e MEDINA, 2005; KAHN, 2008; SCARIOT, 2015). O mesocarpo dos frutos é rico em pró-vitamina

A. A espécie *A. aculeatum* apresenta o mesocarpo mais adocicado das espécies supracitadas, com expressiva participação no mercado regional, especialmente no estado do Amazonas, sendo utilizado no preparo de diversas receitas, como por exemplo, pizzas, hambúrgueres, tapioca, dentre outros (LORENZI *et al.*, 2004; SHANLEY e MEDINA, 2005; FERREIRA e GENTIL, 2006; KAHN, 2008). Os frutos de *A. vulgare* e *A. murumuru* são muito utilizados para alimentar a fauna, constituindo importante fonte de alimento para macacos, esquilos, caititus e queixadas (LORENZI *et al.*, 2004; SHANLEY e MEDINA, 2005). As quatro espécies, assim como muitas outras palmeiras são consideradas espécies-chave no ambiente onde ocorrem por fornecerem frutos ao longo do ano para a fauna (DRANSFIELD *et al.*, 2008; SCARIOT, 2015).

As sementes dessas espécies são utilizadas como matérias primas para a confecção de anéis, brincos e colares (SHANLEY e MEDINA, 2005). Segundo KAHN (2008), o líquido do endosperma de *A. aculeatum* é usado como colírio e o endocarpo utilizado como vasilha por índios Xamãs para servir porções a doentes, e também em jogos por crianças no estado do Amazonas. A partir do mesocarpo e do endocarpo podem também ser obtidos óleos vegetais ricos em ácidos graxos do tipo oleico e láurico, respectivamente, que têm aumentado o interesse na pesquisa dessas espécies (SCARIOT, 2015). Esses óleos têm sido utilizados na produção de cosméticos e recentemente, no caso da espécie *A. murumuru*, e devido à sua qualidade, *A. aculeatum* e *A. vulgare* vêm sendo apontadas como matérias primas promissoras para produção de agrocombustíveis (CLEMENT *et al.*, 2005; KAHN, 2008; SCARIOT, 2015).

Dados a respeito da produção dessas três espécies indicam que uma palmeira típica de *A. vulgare* chega a produzir 50 kg de frutos, distribuídos em

aproximadamente cinco cachos, que é a produção média por planta anualmente (SHANLEY e MEDINA, 2005); a espécie *A. murumuru* segundo relatos encontrados por Bezerra (2008), chega a produzir cerca de cinco cachos ao ano, com média de 8,81 kg de fruto/cacho. Dados de produção para *A. aculeatum* apontam um rendimento, por hectare na safra, de cerca de 117 sacas de 45kg (contendo aproximadamente 900 frutos) (MACÊDO *et al.*, 2015). Vale ressaltar, no entanto, que a exploração de frutos dessas espécies é baseada quase que totalmente no extrativismo. Pelo exposto se percebe que a produção de frutos é expressiva sem que as espécies tenham sido ao menos domesticadas, o que demonstra o potencial para o melhoramento genético.

As folhas dessas palmeiras são utilizadas para obtenção de fibras, sendo que as de *A. aculeatum* e *A. vulgare* são comumente utilizadas na confecção de cestas, redes para dormir, bolsas e redes de pesca (KAHN, 2008; SCARIOT, 2015). A espécie *A. murumuru* foi apontada por Rocha e Potiguara (2007) como potencial para uso na indústria de papel, mas necessita de estudos de resistências físico-mecânicas para a consolidação deste diagnóstico. Os estipes de algumas espécies, como *A. aculeatum* e *A. murumuru*, são reconhecidos como tendo boa durabilidade e apresentam resistência, apodrecendo com dificuldade, e por isso são indicados como esteios na construção de casas. As raízes de *A. vulgare* são cozidas e usadas por índios Palikur, os quais asseguram a eficácia contra furunculoses (KAHN, 2008). Dos estipes também se pode extrair palmito, e de acordo com Balslev *et al.* (2008) extratos do palmito de algumas espécies são usados como remédio para a cura de hepatites e dores nas costas.

2.4. Diversidade genética e os marcadores moleculares

Antes do advento dos marcadores moleculares, os estudos de diversidade genética limitavam-se à análise de caracteres quantitativos, que do ponto de vista da genética de populações, possuem importantes inconvenientes (HAMRICK *et al.*, 1992). Primeiramente, a análise desse tipo de característica impossibilita que os níveis de diversidade genética sejam estimados diretamente de uma população natural, uma vez que os caracteres quantitativos sofrem influência ambiental. Outra limitação vem do fato de muitos caracteres morfológicos possuírem herança poligênica, que impede a estimativa de medidas de diversidade como porcentagem de locus polimórficos e heterozigosidade. Além do mais, muitos caracteres quantitativos são dependentes de determinada fase de desenvolvimento para serem expressos (HAMRICK *et al.*, 1992).

O conhecimento do nível e distribuição da diversidade genética em populações de uma determinada espécie é crucial no planejamento de estratégias de conservação e manejo (LOVELESS e HAMICK, 1984), permitindo uma utilização adequada do recurso genético, sendo importante objeto de pesquisas básicas e aplicadas (MONDINI *et al.*, 2009). Grande avanço nessa área foi conquistado com o advento de técnicas eletroforéticas (uso de isoenzimas) que possibilitaram a estimação diretamente em populações naturais de medidas de diversidade genética entre e dentro de populações (HAMRICK *et al.*, 1992; MONDINI *et al.*, 2009). A quantidade de dados disponíveis para espécies vegetais depois do surgimento dessa metodologia permitiu a descoberta de importantes correlações entre características ecológicas, como distribuição geográfica, sistema de acasalamento, tipo de polinização e dispersão, entre

outros com estruturação da diversidade genética entre e dentro de populações (LOVELESS e HAMRICK, 1984; HAMRICK *et al.*, 1992).

O desenvolvimento de marcadores moleculares trouxe avanço ainda maior para estudos de diversidade genética, uma vez que preencheram as limitações que as técnicas eletroforéticas apresentavam, como a relativa pouca quantidade de marcadores enzimáticos disponíveis por espécie (cerca de 30) e a baixa cobertura do genoma, por serem restritos à parte que se expressa (MONDINI *et al.*, 2009). Os marcadores moleculares, por outro lado, são aplicáveis à qualquer região do genoma, gênica e intergênica, permitindo a detecção de polimorfismos que não produzem efeito fenotípico. Tal como as isoenzimas, não sofrem influência ambiental e nem possuem efeito epistático e pleiotrópico (MONDINI *et al.*, 2009).

2.4.1. Estudos de diversidade genética em espécies de palmeiras

A literatura disponível acerca da diversidade genética em populações de espécies de palmeiras tem aumentado nas últimas décadas. Estudos com marcadores moleculares do tipo dominante, como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), não permitem a estimativa de muitos parâmetros de genética de populações por não conseguirem diferenciar genótipos homocigotos (A/A) e heterocigotos (A/-), e portanto limitam-se a informar o nível de distribuição genética entre e dentro de populações de palmeiras, como por exemplo o trabalho desenvolvido por Sreeumar e Renuka (2006) com a espécie *Calamus thwaitesii* Becc., no qual verificaram que 70,79% da variação genética encontrava-se dentro das oito populações investigadas.

Os trabalhos mais expressivos na área envolvendo espécies da família Arecaceae utilizam técnicas eletroforéticas (isoenzimas ou alozimas) e marcadores microssatélites. A maioria desses estudos tem focado no nível de diversidade genética e como essa diversidade encontra-se estruturada entre e dentro de populações. Altos níveis de heterozigosidade têm sido encontrados em populações de palmeiras, como por exemplo os estudos analisando a diversidade em populações de *Astrocaryum aculeatum* (RAMOS *et al.*, 2012; 2016), *Astrocaryum jauari* (OLIVEIRA *et al.*, 2014), *Cocos nucifera* (PERERA *et al.*, 2000), *Euterpe edulis* (GAIOTTO *et al.*, 2003; CONTE *et al.*, 2008), *Geonoma schottiana* (SILVA *et al.*, 2011), *Mauritia flexuosa* (FEDERMAN *et al.*, 2014) *Oenocarpus bataua* (OTTEWELL *et al.*, 2012), *Phoenix dactylifera* (ELSHIBLI e KORPELAINEN, 2008), em que estimativas de heterozigosidade observada foram superiores a 0,5. Estudos onde foram encontrados baixos níveis de heterozigosidade ($H_o \leq 0.3$) geralmente estão associados à espécies de palmeira com distribuição mais restrita ou em risco de extinção, como por exemplo trabalhos desenvolvidos com populações de *Acrocomia emensis* (NEIVA *et al.*, 2016), *Coccothrinax jimenezii* (JESTROW *et al.*, 2016) e *Livistona carinensis* (SHAPCOTT *et al.*, 2009).

Outros parâmetros populacionais, como os coeficientes de endogamia de Wright e fluxo gênico também tem sido investigados. De forma geral, as estimativas de F_{ST} , que indica o nível de diferenciação genética entre populações, nas espécies de palmeiras estudadas são baixas, indicando dessa forma que a maior parte da diversidade genética é encontrada dentro das populações (SHAPCOTT, 1999; ELSHIBLI e KORPELAINEN, 2008; NAMOFF *et al.*, 2011; GIOVINO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014; PEÑALOZA-RAMÍREZ *et al.*, 2016; NEIVA *et al.*, 2016), fato este esperado

para espécies com características ecológicas e hábito de vida similares aos das palmeiras (HAMRICK *et al.*, 1992). As estimativas de endogamia por acasalamento de indivíduos aparentados, F_{IS} , apresenta ampla variação entre as espécies de palmeiras estudadas (SHAPCOTT, 1999; CONTE *et al.*, 2003, 2008; ELSHIBLI e KORPELAINEN, 2008; MARTINS-CORDER *et al.*, 2009; SHAPCOTT *et al.*, 2009; NAMOFF *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011; OTTEWELL *et al.*, 2012; NAZARENO e REIS 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014; JESTROW *et al.*, 2016; NEIVA *et al.*, 2016; PEÑALOZA-RAMÍREZ *et al.*, 2016; RAMOS *et al.*, 2016), sendo essa variação provavelmente devido a distribuição espacial dos indivíduos nas populações e abundância de polinizadores. As estimativas de fluxo gênico histórico, Nm , a partir da migração de sementes e grãos de pólen encontradas em espécies de palmeiras tem sido moderadas, inferior a 10 (SHAPCOTT, 1998; MARTINS-CORDER *et al.*, 2009; SHAPCOTT *et al.*, 2009; PEÑALOZA-RAMÍREZ *et al.*, 2016; RAMOS *et al.*, 2016), mas suficientes para manter baixos níveis de diferenciação genética entre populações.

Em geral, estudos com marcadores microssatélites têm encontrado maior porcentagem de polimorfismo, número médio de alelos por locus e estimativas de heterozigosidades esperada e observada (CONTE *et al.*, 2008; ELSHIBLI e KORPELAINEN, 2008; CHOO *et al.*, 2010; NAMOFF *et al.*, 2011) quando comparados a resultados apresentados por estudos com marcadores enzimáticos (SOSA *et al.*, 1998; CONTE *et al.*, 2003; MARTINS-CORDER *et al.*, 2009), o que era esperado uma vez que esse tipo de marcador sofre seleção neutra, permitindo o acúmulo de mutações sem alterar fenótipo (MONDINI *et al.*, 2009).

Uma tendência interessante apontada em alguns estudos é a seleção a favor de indivíduos heterozigotos. Conte *et al.* (2003), estudando a diversidade genética e recrutamento em populações de *Euterpe edulis* Mart., observaram mudança no sentido em que a população se desviava do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), com tendência de aumento na frequência de heterozigotos através dos cinco estádios de vida analisados. Lanes *et al.* (2016), analisando o sistema de acasalamento e composição genética na espécie *Acrocomia aculeata*, também encontraram aumento de heterozigosidade em indivíduos adultos, e sugeriram a ocorrência de seleção contra homozigotos. A mesma tendência foi encontrada para espécie *Phoenix dactylifera* L. (ELSHIBLI e KORPELAINEN, 2008) e em outro estudo conduzido com a espécie *E. edulis* (REIS *et al.*, 2000). Conte *et al.* (2003) sugeriram a ocorrência de mecanismos de depressão por endogamia para explicar a baixa adaptabilidade de genótipos homozigotos. No entanto, Shapcott (1999), avaliando o nível de diversidade genética em cinco espécies do gênero *Pinanga* detectou valores significativamente altos de endogamia para todas as espécies, de forma que a quantidade observada de homozigotos nas populações encontrava-se muito superior ao esperado pelo EHW. Segundo o autor, como as estimativas de fluxo gênico não foram baixas e o nível de diferenciação genética entre populações não chegou a 30%, o alto nível de endogamia deve ser explicado pela ocorrência de mecanismos de auto-compatibilidade. Na família *Arecaceae* há espécies monóicas, dióicas e hermafroditas e pouco se sabe sobre a ocorrência de auto-compatibilidade ou mecanismos de auto-incompatibilidade. No gênero *Astrocaryum*, por exemplo, existe apenas um trabalho desenvolvido na década de 1980 (Burquez *et al.*, 1987), no qual as inflorescências autofecundadas não produziram frutos, confirmando a presença de auto-incompatibilidade.

Apesar da vasta literatura disponível, até o presente momento, não há informações acerca da diversidade genética em populações de *A. murumuru*, *A. paramaca* e *A. vulgare*.

2.5. Estudos citogenéticos na família Arecaceae

As análises citogenéticas fornecem informações que podem ter grande utilidade na diferenciação de taxa relacionados. O número, assim como a morfometria dos cromossomos são características amplamente usadas em estudos de citotaxonomia, auxiliando na delimitação taxonômica mais clara de espécies de grupos complexos, principalmente onde as características fenotípicas não são suficientes para discriminá-los (STACE, 2000; ORTOLANI *et al.*, 2007). Juntamente com outras características citológicas, possibilitam estudos evolutivos de um determinado grupo, por meio da compreensão das variações genéticas envolvidas na diferenciação destes taxa (RÖSER, 1994; 1995). Estudos cariotípicos são também de grande valia para a caracterização de bancos de germoplasma, assim como para estudos de conservações de espécies ameaçadas de extinção, e para o melhoramento vegetal (AULER, BATTISTIN e REIS, 2006; KARSBURG e BATTISTIN, 2006).

Embora já existam abordagens citogenéticas mais sofisticadas, que permitem a localização de regiões específicas no genoma dos organismos, como os bandeamentos DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) e CMA (cromomicina A₃), além das hibridizações FISH (Hibridização *in situ* fluorescente) e GISH (Hibridização *in situ* genômica), as metodologias clássicas, como o estudo de cariótipo com coloração convencional e bandeamentos não fluorescentes, continuam sendo de grande relevância, visto que para muitas espécies,

especialmente as nativas como é o caso das espécies do gênero *Astrocaryum*, não se tem informação nem do número de cromossomos (ÉDER-SILVA *et al.*, 2007).

Informações citogenéticas para espécies da família Arecaceae têm aumentado desde a década de 1990, podendo ser encontrados estudos que discutem a evolução e tendências de características citológicas para espécies dessa família (RÖSER, 1993, 1994, 1997; CASTILHO *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2008a; OLIVEIRA *et al.*, 2008b; CORRÊA *et al.*, 2009; ABREU *et al.*, 2011; GAIERO *et al.*, 2012; OLIVEIRA, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

2.5.1. Número cromossômico

Um dos trabalhos de maior importância para a família Arecaceae, fornecendo informações a respeito do número de cromossomos para 56 taxa, incluindo todas as cinco subfamílias de Arecaceae, foi realizado por Röser (1994). Neste trabalho o autor encontrou variação para o número cromossômico de $2n = 26$ a $2n = 36$, sendo que até o presente momento não houve relato para número cromossômico diferente dessa faixa. Uma variação significativa já era esperada, uma vez que essa família compreende grande número de espécies, com forte variação morfológica e ampla distribuição ecogeográfica (LLERAS *et al.*, 1983; RÖSER, 1995; VILLACHICA *et al.*, 1996).

De acordo com Röser (1993; 1994; 1995), o número cromossômico $2n=36$ é considerado o mais basal. Este número é comumente encontrado em grupos que apresentam características mais primitivas, como flores hermafroditas, com carpelos livres (apocarpia), inflorescências e folhas pouco especializadas, entre outras, como acontece na subfamília *Coryphoideae*, onde

cerca de 90% dos gêneros apresentam $2n=36$, prevalecendo também em *Phytelephantoideae*. No entanto, o restante das subfamílias, como por exemplo, *Arecoideae*, que mostram características morfológicas mais especializadas, como a distribuição de flores em tríades (uma flor pistilada ladeada por duas estaminadas), esse número é restrito a alguns gêneros, provavelmente mais primitivos.

Trabalhos envolvendo espécies da subfamília *Arecoideae*, pouco investigada nos trabalhos de Röser, têm confirmado suas hipóteses (RÖSER, 1993; 1994). Oliveira *et al.* (2016) ao estudar a citogenética de três espécies do gênero *Euterpe*, *E. edulis*, *E. oleracea* e *E. precatoria*, e Oliveira (2012), em um trabalho comparativo de análises citogenéticas entre cinco espécies do gênero *Oenocarpus*, *O. bacaba*, *O. bataua*, *O. distichus*, *O. mapora* e *O. minor*, encontraram o mesmo número cromossômico, $2n=36$, mas diferenças entre as espécies congêneras foram observadas quanto à morfologia e os pares portadores de satélite. Corrêa *et al.* (2009) estudando aspectos cariológicos de cinco espécies do gênero *Butia*, verificaram que além de todas apresentarem número somático, $2n=32$ cromossomos, elas não diferiram muito quanto à morfologia. Os gêneros *Euterpe* e *Oenocarpus* pertencem à mesma subtribo, *Euterpeinae* que, de acordo com Röser (1995), corresponde ao grupo onde o número cromossômico $2n=36$ é bem mais documentado, porém não sendo muito frequente para outros grupos da subfamília *Arecoideae*.

A constância no número cromossômico entre espécies de um mesmo gênero é fato comum em espécies de palmeiras (RÖSER, 1994, 1995; OLIVEIRA, 2012; CORRÊA *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.* 2016), podendo muitas vezes manter-se constante em níveis taxonômicos mais elevados, como

tribos e até mesmo subfamília (Röser, 1994). Apesar de não muito comuns algumas exceções já foram relatadas. Em um estudo sobre a comparação intersexual de quatro espécies de do gênero *Chamaedorea*, Cepeda-Cornejo *et al.* (2012) encontraram $2n = 32$ para *C. tepejilote* e *C. alternans*, e $2n = 26$ para *C. pinnatifrons* e *C. ernesti-augusti*. Variações para o número de cromossomos entre espécies congêneras também já foi observado em *Ravenea* com $2n = 30$ e 32 (RÖSER *et al.*, 1997), *Calamus* com $2n = 26$ e 28 , e *Raphia* com $2n = 28$ e 32 (RÖSER, 1994; 2000).

O número cromossômico $2n=36$ também sugere que o número básico original dessa família seja $x=18$ (RÖSER, 1995). No entanto, de acordo com Goldblatt (1980) qualquer espécie que apresente número básico maior que $x=9$ deve ter eventos de poliploidia ao longo de sua história evolutiva e, portanto, todas as espécies de palmeiras devem compartilhar um ancestral poliploide. Faltam, entretanto, estudos que suportem essa teoria. Dessa forma, atualmente se considera que existam apenas quatro casos de poliploidia em palmeiras, todos relatados para a tribo *Cocoeae*, pertencente à subfamília *Arecoideae*, sendo que para o gênero *Voanioala* foi relatado o maior nível de poliploidia, cerca de 38 vezes o número básico, com $2n=606 \pm 3$.

As mudanças no número de cromossomos indicam uma tendência evolutiva de redução não havendo indícios quaisquer de que esta tendência tenha sido revertida para qualquer um dos grupos. Em um estudo comparativo entre três gêneros proximamente relacionados de *Corypheae*: *Livistoninae*, *Livistona* ($2n=36$), *Johannesteijsmania* ($2n=34$) e *Licuala* ($2n=28$), Röser (1995) verificou significativa redução do número cromossômico e mudanças na morfologia no sentido de diminuição da simetria com redução da quantidade de cromossomos

metacêntricos, que, no entanto, não foram acompanhadas por redução proporcional da quantidade 2C DNA e nem da área cromossômica. Na verdade, o autor observou um acréscimo na média de quantidade de DNA e na área por cromossomo. Essas observações indicam que a redução do número cromossômico, pelo menos para esse grupo, não foi devido a eventos de aneuploidia ou fusões cêntricas, sendo mais provavelmente resultante de inversões pericêntricas e/ou translocações recíprocas envolvendo segmentos cromossômicos desiguais (RÖSER, 1995).

2.5.2. Características do núcleo interfásico e padrão de bandejamento

A cromatina no núcleo interfásico é constituída basicamente por eucromatina, que pode estar na forma difusa ou condensada, e pela heterocromatina. A proporção diferenciada de eucromatina condensada de espécie para espécie, possibilita a classificação do núcleo interfásico em três tipos distintos: reticulado, semi reticulado e arreticulado (GUERRA, 1984). Segundo o mesmo autor, estudos detalhados acerca da organização da cromatina no núcleo interfásico podem se constituir em excelente indicador de alterações cariotípicas.

Os dados disponíveis na literatura apontam ampla diversidade para a organização da cromatina no núcleo interfásico de espécies de palmeiras (RÖSER, 1993; 1994; OLIVEIRA, 2011; GESTEIRA *et al.*, 2012), havendo ocorrência dos três tipos propostos por Guerra (1984).

De acordo com Röser (1994) parece que há certa correlação entre o tamanho cromossômico e o tipo de núcleo interfásico em espécies de palmeiras, onde espécies com cromossomos maiores tendem a apresentar núcleo do tipo

reticulado, e espécies com cromossomos menores, núcleo do tipo semi-reticulado a arreticulado. Espécies da subtribo *Thrinacinae*, que possuem grandes cromossomos e CTLH de cerca de 70 μm , apresentam frequentemente núcleo interfásico denso, do tipo reticulado, caracterizado pela presença de 15-25 cromocentros bem corados e de formato irregular (RÖSER, 1993; 1994). Em estudos citogenéticos de três espécies de *Euterpe* (*E. edulis*, *E. oleracea* e *E. precatória*) foram verificados CTLH de aproximadamente 50 μm e núcleo interfásico do tipo semi-reticulado, evidenciado pela formação de estruturas cromatínicas fortemente pigmentadas (OLIVEIRA, 2011), que corroboram com as inferências feitas por Röser (1994).

No entanto, Röser (1994) sugeriu que as estruturas do núcleo interfásico não são controladas apenas pelo tamanho cromossômico, o que acarretaria uma demanda espacial de organização da cromatina, mas também que o grau de condensação da eucromatina seja possivelmente influenciado e controlado pela presença de sequências de DNA pouco a moderadamente repetitivas, que influenciariam de alguma forma a capacidade espacial de empacotamento. O mesmo autor comenta que estudos desenvolvidos anteriormente já mostravam que mudanças na quantidade de DNA total entre espécies foram mais correlacionadas com diferenças na quantidade desses DNAs do que com diferenças na quantidade de DNA altamente repetitivo ou sequências gênicas.

A proporção de eucromatina condensada e descondensada também interfere no padrão de condensação dos cromossomos na prófase (mais uniforme a assincrônico), mas é sobreposto pela estrutura heterocromática, que pode ser visualizada por alguns bandeamentos (RÖSER, 1994). O uso de técnicas de bandeamento, que diferenciam longitudinalmente os cromossomos, permite a

construção de mapas físicos dos cromossomos de uma espécie, além de possibilitar a identificação e a caracterização individual destes, por meio da quantidade e/ou posição das bandas nos respectivos cromossomos (MORAES, 2007). Röser (1994) observou no padrão demonstrado pelos taxa investigados que os cromossomos de espécies de palmeiras não são predominantemente constituídos por heterocromatina como se pensava.

A heterocromatina foi evidente em cromossomos profásicos de taxa com núcleo procromossomal, muitas vezes apresentando bandas DAPI⁺, que são regiões ricas em A-T, como acontece em *Coryphoideae-Licuala* e *Johannesteijsmannia*, ou fluorocromo neutro, como em *Phytelephantoideae*. Bandas DAPI⁺ também foram encontradas em porções subterminais de espécies de *Calamus* ou em várias regiões cromossômicas como acontece em *Aphandra natalia*. Além disso, bandas DAPI⁺ proximais não parecem ser muito raras em palmeiras, como por exemplo em *Trithrinax brasiliensis*, e a ocorrência em taxa distantemente relacionados sugere que se trata de um evento independente (RÖSER, 1994).

Bandas CMA⁺ constituem segmentos de DNA ricos em pares de bases C-G. Um padrão interessante foi encontrado na espécie *Rhapis subtilis*, onde todos os cromossomos apresentaram bandas proximais CMA⁺, as quais também reagiram positivamente com Giemsa (RÖSER, 1994). Em um estudo citogenético desenvolvido com a espécie *Trithrinax campestris*, Gaiero *et al.* (2012) encontraram padrões similares aos citados por Röser (1993; 1994) para outras espécies da mesma subfamília. A espécie apresentou 2n=36, com cromossomos grandes, mas uma quantidade não usual de heterocromatina foi encontrada, correspondendo a 39% do comprimento cromossômico total. A

maior parte da heterocromatina foi observada na forma de bandas DAPI⁺, frequentemente encontrada em regiões subterminais e correspondendo 31,3% do observado, e o restante consistiu em bandas CMA⁺ (GAIERO *et al.*, 2012).

Outra característica cariológica observada nos trabalhos de Röser (1993; 1994; 1995) diz respeito aos segmentos NOR, que nos taxa analisados foram mais comumente encontrados em dois ou quatro e, mais raramente, em seis pares cromossômicos. Esses segmentos frequentemente estavam localizados nos braços curtos dos cromossomos, ocorrendo algumas vezes perto dos telômeros, mas há relatos de ocorrência nos braços longos (RÖSER, 1994; OLIVEIRA, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2016). Röser (1994) também sugeriu que a variabilidade encontrada na estrutura de cromossomos-NOR indica um envolvimento frequente destes cromossomos em mutações que podem resultar em polimorfismos, como, por exemplo, na forma de pares heteromórficos, o que parece algo frequente em palmeiras.

Apesar da quantidade de informações disponíveis para a família Arecaceae, Röser (1994) reforça que ainda faltam estudos para esclarecer se algumas características observadas nos bandeamentos (por exemplo, braços heterocromáticos, bandas DAPI⁺ subterminais, entre outros) são típicas para algumas unidades taxonômicas em um nível maior.

2.5.3. Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

A aplicação da FISH em espécies vegetais tem permitido ampliar o número de marcadores cromossômicos em estudos de análise cariotípica comparada, além de possibilitar a localização de genes ou sequências repetitivas no complemento cromossômico (GUERRA, 2004).

Em espécies de palmeiras, esse tipo de estudo ainda é raro. O primeiro trabalho utilizando hibridização *in situ* foi desenvolvido na espécie *Elaeis guineensis*, por Castilho *et al.* (2000), em que os autores observaram a presença de um par de sequências 18S-25S e 5S de rDNA nos cromossomos 16 e 1, respectivamente, ambas localizadas no braço curto, próximo à porção terminal, e as sequências teloméricas foram observadas apenas nas porções terminais dos cromossomos. Madon *et al.* (2001), visando mapear as sequências 18S-25S, e 5S e 18S-5.8S-25S de rDNA na espécie *Elaeis oleifera* e no híbrido interespecífico OxG (*E. oleifera* x *Elaeis guineensis*), respectivamente, encontraram 1 par de sequências 18S-25S rDNA e 18S-5.8S-25S na porção terminal do par cromossômico acrocêntrico de *E. oleifera* e do híbrido, respectivamente, e um par de sequência 5S foi observado no maior cromossomo do complemento haploide do híbrido. Em um trabalho com a espécie *Trithrinax campestris*, Gaiero *et al.* (2012) encontraram quatro pares de cromossomos com sítios 45S de rDNA, os quais situaram-se na mesma posição das bandas CMA⁺, e apenas um par portando o sítio 5S de rDNA. Juntamente com os resultados do bandeamento DAPI/CMA os autores conseguiram identificar cada par cromossômico de *T. campestris*, possibilitando estudos de variações cariotípicas entre populações, além de estudos comparativos com espécies relacionadas (GAIERO *et al.*, 2012). O trabalho mais recente utilizando a metodologia de hibridização *in situ*, desenvolvido por Adawy *et al.* (2015), visou verificar a associação de sequências de rDNA com a diferenciação sexual de plantas macho e fêmea da espécie *Phoenix dactylifera*. Os autores não verificaram diferenças quanto às marcas 5S, sendo que tanto indivíduos machos quanto fêmea apresentaram apenas um par situado na porção proximal. No entanto, as marcas 45S diferiram

entre os indivíduos machos, que apresentavam três marcas, e fêmeas, com apenas duas, todas situadas na região terminal dos cromossomos.

Devido a pouca quantidade de informação disponível para a família *Arecaceae* e dado a grande quantidade de espécies que a compõe, ainda não é possível propor tendências para número, posição das sequências 45S e 5S. Muito ainda precisa ser estudado para que tendências evolutivas consigam ser sugeridas para esse grupo.

REFERÊNCIAS

A. FILHO, C. J. **Estudos citogenéticos do Babaçu (*Orbignya spp.*)**. Dissertação apresentada à Universidade de São Paulo [Mestrado]. 1986.

AULER, N. M. F.; BATTISTIN, A.; REIS, M. S. Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) D.C.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 8, n. 2, p. 55-63, 2006.

BARELLA, A. P. W.; KARSBURG, I. V. Caracterização morfológica dos cromossomos mitóticos de *Parkia pendula* (WILLD.) BENTH ex WALP. e *Dinizia excelsa* DUCKE (FABACEAE, MIMOSOIDEAE). **Rev. de Ciências Agro-ambientais**, v. 5, n. 1, p. 85-93, 2007.

BALSLEV, H. et al. Palmas (Arecaceae) útiles en los alrededores de Iquitos, Amazonía Peruana. **Rev. Peru. biol.**, v. 15, n. 1, p. 121-132. 2008.

BENNETT, M.D; LEITCH, I. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, v. 76, p. 113–176. 1995.

BEZERRA, V. S. **Aspectos do estado da arte, da produção e pesquisa com a palmeira murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart.)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 5.; CLÍNICA TECNOLÓGICA EM BIODIESEL, 2. 2008, Lavras. Biodiesel: tecnologia limpa: Anais completos. Lavras: UFLA, 2008.

BÚRQUEZ, A.; SARUKHÁN, J.K.; PEDROSA, A.L. Floral biology of a primary rain forest palm, *Astrocaryum mexicanum* Liebm. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 94, p. 407-419. 1987

BUTTOW, M.V.; CASTRO, C.M.; SCHWARTZ, E.; TONIETTO, A.; BARBIERI, R.L. Caracterização molecular de populações de *Butia capitata* (Arecaceae) do Sul do Brasil através de marcadores AFPL. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n.1, p. 230-239. 2010

CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 3ª ed. CEJUP, CNPq. Museu Paraense Emílio Goeldi – Coleção Adolfo Ducke. Belém. 279 pp. 1991.

CHOO, J.; ISHAK, H.; SIMPSON, B.; MUELLER, U.; JUENGER, T. Characterization of 14 microsatellite loci in a tropical palm, *Attalea phalerata* (Arecaceae). **American Journal of Botany**, St. Louis, v.99, n.11, p.105-106, 2010.

CLEMENT, C. R.; LLERAS PÉREZ, E.; VAN LEEUWEN, J. O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. **Agrociências**, Montevideo, v. 9, n. 1-2, p. 67-71. 2005.

CONTE, R.; NODARI, R.O.; VENCOVSKY, R.; REIS, M.S. Genetic diversity and recruitment of the tropical palm, *Euterpe edulis* Mart., in a natural population from the Brazilian Atlantic Forest. **Heredity**, v. 91, p.401-406. 2003.

CONTE, R.; REIS, M.S.; MANTOVANI, A.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and mating system of *Euterpe edulis* Mart. populations: A comparative analysis using microsatellite and allozyme markers. **Journal of Heredity**, v. 99, n. 5, p. 476-482. 2008.

CORREA, L. B. *et al.* Caracterização citológica de palmeiras do gênero *Butia* (Arecaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 4, p. 1111-1116. Dez, 2009.

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

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University, 1981.

DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**. v 95, p. 99–110. 2005.

DOLEŽEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, v. 38, n. 3, p. 285-302. 1997.

ÉDER-SILVA, E.; FELIX, L. P.; BRUNO, R. L. A. Citogenética de algumas espécies frutíferas nativas do nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 110-114, abr. 2007.

ELSHIBLI, S.; KORPELAINEN, H. Microsatellite markers reveal high genetic diversity in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) germoplasm from Sudan. **Genetica**, v. 134, p. 251-260. 2008.

FAO. **Espécies forestales productoras de frutas y otros alimentos**. 3. Ejemplos de America Latina. Estudio FAO Montes 44/3. Roma: FAO. 241p. 1987.

FEDERMAN, S.; HYSENI, C.; CLEMENT, W.; OATHAM, M. P.; CACCONE, A. Habitat fragmentation and the genetic structure of the Amazonian palm *Mauritia flexuosa* L.f. (Arecaceae) on the island of Trinidad. **Conservation Genetics**, v. 15, n. 2, p. 355-362. 2014.

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

GAIERO, P. et al. An unusually high heterochromatin content and large genome size in the palm tree *Trithrinax campestris* (Arecaceae). **Australian Journal of Botany**, v. 60, p. 378-382, 2012.

GESTEIRA, G.S.; OLIVEIRA, N. P.; OLIVEIRA, M. S. P.; DAVIDE, L. C. Caracterização de núcleos interfásicos das espécies *Oenocarpus bataua* Mart. e *Oenocarpus mapora* H. Karst. (Arecaceae). In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFLA, 25, 2012, Lavras. **Anais...** XXV Congresso de Iniciação Científica da UFLA, 2012.

GIOVINO, A.; SCIBETTA, S.; SAIA, S.; GUARINO, C. Genetic and morphologic diversity of European fan palm (*Chamaerops humilis* L.) populations from different environments from Sicily. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 176, p. 66-81. 2014.

GOLDBLATT, P. **Polyploidy in angiosperms: dicotyledons**. In W. H. Lewis [ed.], *Polyploidy: biological relevance*, 291-240. Plenum Press, New York, NY. 1980.

GOMES, L.R.P.; LOPES, M.T.G.; BENTES, J.L.S.; BARROS, W.S.; COSTA NETO, P.Q.; CONTIM, L.A.S. Genetic diversity in natural populations of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 11, p. 216-223. 2011.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Riberão Preto: FUNPEC, 191p. 2002.

GUERRA, M. **Estrutura e diversificação dos núcleos interfásicos em plantas**. In: AGUIAR-PERECIN, H. L. R.; MARTINS, P. S. & BANDEL, G. (eds) *Tópicos de citogenética e evolução de plantas*. Soc. Bras. de Genética, Riberão Preto. p. 137-153, 1984.

GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenet Genome Res**, v. 120, p. 339-350. 2000.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W.; SHERMAN-BROYLES, S.L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. **New forests**, v. 6, p. 95-124. 1992.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. **Field guide to the palm of the Americas**. Princeton University Press, Princeton. 352p. 1997.

JESTROW, B.; PEGUERO, B.; JIMÉNEZ, F.; CINEA, W.; HASS, M.; REEVE, A.; MEEROW, A. W.; GRIFFITH, M. P.; MAUNDER, M.; FRANCISCO-ORTEGA, J. Genetic diversity and differentiation of the critically endangered Hispaniolan palm *Coccothrinax jimenezii* M.M. Mejía & R.G. García based on novel SSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 66, n. 1, p. 216-223. 2016.

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

KAHN, F. The genus *Astrocaryum*. **Rev. Peru. Biol.**, v. 15, n. 1, p. 31-48. 2008.

KARSBURG, I. V.; BATTISTIN, A. Meiose e número cromossômico de cinco espécies da família Urticaceae do Rio Grande do Sul. **Rev. de Ciências Agro-ambientais**, v. 4, n. 1, p. 47-60. 2006.

LANES, E. C. M.; MOTOIKE, S. Y.; KUKI, K. N.; RESENDE, M. D.; CAIXETA, E. T. Mating system and genetic composition of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*): Implications for breeding and genetic conservation programs. **Journal of heredity**, esw038, 2016.

LEITMAN, P.; HENDERSON, A.; NOBLICK, L.; SOARES, K. *Areaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15670>>. Acesso em: 12 Nov. 2013.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, Lund, v. 52, p. 201-220, 1964.

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

LOPES, J. P. N.; CORREA, N. C. F. ; FRANÇA, L. F. Transesterificação do óleo de murumuru (*Astrocaryum murumuru*) para a produção de biodiesel. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília, DF. **Anais ...** Brasília, DF: MCT/ABIPTI, 2007.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; MEDEIROS-COSTA, J. T.; CERQUEIRA, L. S. C.; FERREIRA, E. Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas. **Plantarum**, Nova Odessa. 432p. 2004.

LOUREIRO, J. C. M. **Flow cytometric approaches to study plant genomes**. Tese apresentada à Universidade de Aveiros [Doutorado]. 2007.

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.T. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 15, p. 65-95. 1984.

MACÊDO, J. L. V de; RAMOS, S. L. F.; LOPES, M. T. G.; COSTA, J. R. da; LEEUWEN, J. V.; LIMA, R. M. B. de; SILVA, P. P da. Tucumã-do-amazonas. In: LOPES, R.; OLIVEIRA, M. do S. P. de; CAVALLARI, M. M.; BARBIERI, R. L.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S. da S.; **Palmeiras nativas do Brasil**. Belém, cap. 12, 371-393 p. 2015.

MARTINS-CORDER, M.P.; FIALHO, L.E.B.; ZAMBIAZI, D.C.; KONZEN, E.R. Análise da diversidade genética de populações de palmito (*Euterpe edulis* MARTIUS) através de marcadores isoenzimáticos. **Revista Ceres**, v. 56, n. 2, p. 204-213. 2009.

MEEROW, A.W.; WISSER, R.J.; BROWN, J.S.; KUHN, D.N.; SCHNELL, R.J.; BROCHAT, T.K. Analysis of genetic diversity and population structure within Florida coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm using microsatellite DNA, with special emphasis on the Fiji Dwarf cultivar. **Theoretical Applied Genetics**, v. 106, p. 715-726. 2003.

MORAES, I. C. R. **Caracterização citogenética da biologia reprodutiva de três espécies do gênero *Hypericum* L. (Clusiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico. Campinas, 2007.

NAMOFF, S.; VELOZ, A.; JIMÉNEZ, F.; RODRÍGUEZ-PEÑA, R.A.; PEGUERO, B.; LEWIS, C.; MOYNIHAN, J.; ABDO, M.; MAUNDER, M.; WETTBERG, E.V.; MEEROW, A.W.; GRIFFITH, M.P.; FRANCISCO-ORTEGA, J. Sweet drinks are made of this: Conservation genetics of an endemic palm species from the Dominican Republic. **Journal of Heredity**, v. 102, n. 1, p. 1-10. 2011.

NEIVA, D. S.; MELO JÚNIOR, A. F.; OLIVEIRA, D. A.; ROYO, V. A.; BRANDÃO, M. M.; MENEZES, E. V. *Acrocomia emensis* (Arecaceae) genetic structure and diversity using SSR molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1, p. 1-11. 2016.

OLIVEIRA, L.D.S.; RAMOS, S.L.F.; LOPES, M.T.G.; DEQUIGIOVANNI, G.; VEASEY, E.A.; MACÊDO, J.L.V.; BATISTA, J.S.; FORMIGA, K.M.; LOPES, R. Genetic diversity and structure of *Astrocaryum jauari* (Mart.) palm in two Amazon river basins. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 14, p. 166-173. 2014.

OLIVEIRA, M do S. P.; ABREU, L. F.; NASCIMENTO, W. M. O.; PARACAMPO, N. E. N. P. **Tucumã-do-Pará**. In: LOPES, R; OLIVEIRA, M do S. P de; CAVALLARI, M.M; BARBIERI, R. L; CONCEIÇÃO, L.D.H.C.S da (editores). *Palmeiras Nativas do Brasil*, Brasília, DF: Embrapa, 2015. Cap.13, p. 17-33.

OLIVEIRA, N. P. de *et al.* **Contagem cromossômica em *Astrocaryum vulgare* Mart.** In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2008, Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, v. 1. p. 180-180. 2008a.

OLIVEIRA, N. P. de *et al.* **Determinação do número cromossômico em espécies do complexo *Oenocarpus/Jessenia*.** In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2008, Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, v. 1. p. 180-180. 2008b.

OLIVEIRA, L. C.; OLIVEIRA, M. S. P.; DAVIDE, L. C.; TORRES, G. A. Karyotype and genome size in *Euterpe* Mart. (Arecaceae) species. **Comparative Cytogenetics**, v. 10, n. 1, p. 17-25. 2016.

OLIVEIRA, N. P. **Estudos polínicos, citogenética e quantidade de DNA nuclear em espécies de *Oenocarpus* Mart. (Arecaceae).** 2012. 98 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

ORTOLANI, F. A.; MATAQUEIRO, M. F.; MORO, J. R. Caracterização citogenética em *Schlumbergera truncata* (Haworth) Moran e *Schlumbergera x buckleyi* (T. Moore) Tjaden (Cactaceae). **Acta Botânica Brasilica**, v. 21, n. 2, p. 361-367. 2007.

PEÑALOZA-RAMÍREZ, J. M.; AGUILAR-AMEZQUITA, B.; NÚÑEZ-FARFÁN, J.; PÉREZ-NASSER, N.; ALBARRÁN-LARA, A. L.; OYAMA, K. Consequences of habitat fragmentation on genetic structure of *Chamaedorea alternans* (Arecaceae) palm populations in the tropical rain forests of Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 87, n. 3, p. 990-1001. 2016.

PLANT list. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em: 09 nov. 2013

PORTELA, R. C. Q.; SANTOS, F. A. M. Caracterização dos estádios ontogenéticos de três espécies de palmeiras: uma proposta de padronização para estudos de dinâmica populacional. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 34, n. 4, p. 523-535. 2011.

RAMOS, S.L.F.; MACÊDO, J.L.V.; LOPES, M.T.G.; BATISTA, J.S.; FORMIGA, K.M.; SILVA, P.P.; SAULO-MACHADO, A.C.; VEASEY, E.A. Microsatellite loci for tucumã of Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) and amplification in other Arecaceae. **American Journal of Botany**, v. 99, p. 508-510. 2012.

RAMOS, S. L. F.; DEQUIGIOVANNI, G.; SEBBENN, A. M.; LOPES, M. T. G.; KAGEYAMA, P. Y.; MACÊDO, J. L. V.; KIRST, M.; VEASY, E. A. Spatial genetic structure, genetic diversity and pollen dispersal in a harvested population of *Astrocaryum aculeatum* in the Brazilian Amazon. **BMC Genetics**, v. 17, n. 1, p.1-10. 2016.

READ, R. W. Chromosome numbers in the Coryphoidea. **Cytologia**, Tokyo, v. 30, p. 385-391, 1965.

READ, R. W. New chromosome counts in palms. **Principes**, Lawrence, v. 28, p. 20-30, 1966.

REIS, M.S.; FANTINI, A.C.; NODARI, R.O.; REIS, A.; GUERRA, M.P.; MANTOVANI, A. Management and conservation of natural populations in Atlantic Rain Forest: the case study of palm heart (*Euterpe edulis* Martius). **Biotropica**, v. 34, n.4b, p.894-902. 2000.

ROCHA, C. B. R.; POTIGUARA, R. C. V. Morfometria das fibras das folhas de *Astrocaryum murumuru* var. *murumuru* Mart. (Arecaceae). **Acta Amazônica**, v. 37, n. 4, p. 511-516. 2007.

RÖSER, M. Chromosome structures and karyotype rearrangement in Palms (Palmae). **Memoirs of the New York Botanical Garden**, New York, n. 83, p. 61-71, 1999.

_____. DNA amounts and qualitative properties of nuclear genomes in palms (Arecaceae). In: WILSON, K. L.; MORRISON, D. A. (Ed.). **Monocots: systematics and evolution**. Melbourne: CSIRO, 2000. p. 538-544.

_____. Pathways of karyological differentiation in palms (Arecaceae). **Plant Systematics and Evolution**, Viena, v. 189, p. 83-122, 1994.

_____. Trends in the karyo-evolution of palms. In: KEW CHROMOSOME CONFERENCE, 4., 1995, Kew. **Proceedings...** Kew: Royal Botanic Gardens, 1995. p. 249-265.

_____. Variation and evolution of karyotype characters in palm subfamily Coryphoideae Sl. **Botanica Acta**, Stuttgart, v. 106, n. 2, p. 170-182, 1993.

RÖSER, M.; JOHNSON, M. A. T.; HANSON, L. Nuclear DNA amounts in palms (Arecaceae). **Botanica Acta**, Stuttgart, v. 110, n. 1, p. 79-89, 1997.

SCARIOT, A. O. **Palmeiras brasileiras: botânica, ecologia, usos e conservação**. In: LOPES, R; OLIVEIRA, M do S. P de; CAVALLARI, M.M; BARBIERI, R. L; CONCEIÇÃO, L.D.H.C.S da (editores). *Palmeiras Nativas do Brasil*, Brasília, DF: Embrapa, 2015. Cap.1, p. 17-33.

SHANLEY P.; MEDINA G. **Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica**. Belém: CIFOR, Imazon, 300 p. 2005.

SHAPCOTT, A. The patterns of genetic diversity in *Carpentaria acuminata* (Arecaceae), and rainforest history in northern Australia. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 833-847. 1998.

SHAPCOTT, A. Comparison of the population genetics and densities of five *Pinanga* palm species at Kuala Belalong, Brunei. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1641-1654. 1999.

SHAPCOTT, A.; DOWE, J.L.; FORD, H. Low genetic diversity and recovery implications of the vulnerable Bankoualé palm *Livistona carinensis* (Arecaceae), from North-eastern Africa and the Southern Arabian Peninsula. **Conservation Genetics**, v. 10, p. 317-327. 2009.

SILVA, M.S.; VIEIRA, F.A.; CARVALHO, D. Diversity and genetic structure in natural populations of *Geonoma schottiana* Mart. (Arecaceae): Implications for conservation. **Revista Cerne**, v. 17, n. 2, p. 195-201. 2011.

SOSA, P.A.; BOUZA, N.; CABRERA-PERÉZ, M.A.; LUQUE, A. Genetic variation in *Phoenix carinensis* and *P. dactylifera* (Arecaceae) populations of Gran Canaria using isozyme electrophoresis. **Boletim do Museu Municipal do Funchal**, v. 5, p. 443-448. 1998.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. São Paulo, Instituto Plantarum. 2005.

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

SREEKUMAR, V.B; RENUKA, C. Assesment of genetic diversity in *Calamus thwaitesii* Becc. (Arecaceae) using RAPD markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 397-405. 2006.

STACE, C. A. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. **Taxon**, v. 49, p. 451–477, 2000.

VALLS, J.F.M. **Caracterização morfológica, reprodutiva e bioquímica de germoplasma vegetal**. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1. 1988, Jaboticabal, *Anais...*: FCAV. p. 106-128. 1988.

VILLACHICA, H. *et al.* **Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia**. p. 264-267. Tratado de Cooperación Amazonica, (TCA-SPT, 44). Lima: FAO. 1996.

Artigo 1

**Population genetic structure of three species in the genus *Astrocaryum* G.
Mey. (Arecaceae)**

Formatado de acordo com a revista Genetics and Molecular Research, à qual o artigo foi submetido.

**Population genetic structure of three species in the genus *Astrocaryum* Mey.
(Arecaceae)**

N.P. Oliveira¹, M.S.P. Oliveira², L.C. Davide³ and S. Kalisz⁴

^{1,3}Laboratório de Citogenética, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil.

²Laboratório de Genética Molecular, Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, Brazil.

⁴Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Tennessee, Knoxville, TN, United States

Corresponding author: N.P. Oliveira

E-mail: naty_poliveira@hotmail.com

ABSTRACT. We assess the level and distribution of genetic diversity in three species of the economically important palm genus *Astrocaryum* located in Pará state, in north Brazil. Samples were collected in three municipalities for *A. aculeatum*: Belterra, Santarém and Terra Santa; and two for both *A. murumuru*: Belém and Santo Antônio do Tauá; and *A. paramaca*: Belém and Ananindeua. Eight microsatellite loci amplified well and were used for genetic analysis. Mean number of alleles per locus for *A. aculeatum*, *A. murumuru* and *A. paramaca* were 2.33, 2.38 and 2.06, respectively. Genetic diversity was similar for the three species, ranging from $H_e = 0.222$ in *A. aculeatum* to $H_e = 0.254$ in *A. murumuru*. Both F_{ST} and AMOVA showed most of the genetic variation is found within populations for all three species, but high genetic differentiation among populations was found for *A. aculeatum*. Three loci were not in Hardy-Weinberg equilibrium, with populations of *A. paramaca* showing a tendency for excess of heterozygotes ($F_{IS} = -0.144$). Gene flow was high for populations of *A. paramaca* ($Nm = 19.35$). Our results suggest that the low genetic diversity within populations, mirrors the genetic differentiation among populations due to high gene flow among population. Greater geographic distances among the three collection sites for *A. aculeatum* likely hampered gene flow for this species.

Key words: Genetic diversity; Gene flow; Microsatellite markers; Amazonia

INTRODUCTION

The palm genus *Astrocaryum* G. Mey. (Arecaceae) comprises 40 species with primary distributions in tropical ecosystems of South and Central America (Kahn, 2008). The genus is comprised of many life forms, from large woody species, such as *A. aculeatum* G. Mey and *A. murumuru* Mart., to small acaulescent palms, such as *A. paramaca* Mart. Because they produce fruits throughout the year, like other species in the Arecaceae, *Astrocaryum* spp. are considered key economic species in the environments where they occur (Dransfield et al., 2008).

Although almost all species of *Astrocaryum* are used by humans, according to Kahn (2008), only a few have real economic potential and significant importance in local and regional trades. Of these, *A. aculeatum* stands out due to its abundant fruits that are widely consumed by humans in the Amazon region and its potential to become an important crop, especially in North of Brazil (Clement et al., 2005; Kahn, 2008). Likewise, *A. murumuru* has been suggested by Clement et al. (2005) as an important palm for the cosmetics industry because of the high quality of its oil. In contrast with the large literature available on these two palm species, there is not much information on *A. paramaca*. However, because *A. paramaca* does not produce central stem, its low stature could facilitate fruit harvest and could be useful in cross breeding programs.

There are few areas with *Astrocaryum* plantations, and these only grow *A. aculeatum*. Fruit harvesting of both *A. aculeatum* and *A. murumuru* is based on exploitation of natural populations (Clement et al., 2005; Macêdo et al., 2015). Ferreira and Gentil (2006), suggest that difficulty in seed germination due

to seed dormancy and, in the case of *A. aculeatum*, the inability to use vegetative propagation, contribute to a lack of interest by farmers to develop these species as crops. However, the absence of adequate management strategies for any species can have a great impact on the genetic diversity of its populations and therefore compromise its long-term survival (Booy et al., 2000).

The genetic diversity of a species can be assessed by quantifying morphological characters and biochemical or molecular markers. Of these, molecular markers offer numerous advantages over the other two types. First, they are stably expressed and detectable in all tissues regardless of growth and cell differentiation (Hamrick et al., 1992; Mondini et al., 2009). Moreover, molecular markers are not influenced by the environment, as are morphological traits (Hamrick et al., 1992). Importantly, microsatellites are especially good for studies of population genetic structure because they are highly polymorphic and allow for the final scale-resolution of population genetic parameters.

Studies of genetic diversity in palm species have been increasing in the last decades, and in most of them level of genetic diversity was high, with percentage of polymorphic loci around 100%, number of alleles per locus superior to four and heterozygosity higher than 0.5 (e.g. Reis et al., 2000; Conte et al., 2003; Meerow et al., 2003; Sreekumar and Renuka, 2006; Choo et al., 2010; Gaiero et al., 2011; Gomes et al., 2011). Other population genetic structure parameters, such as Wright's inbreeding coefficient and gene flow, have shown in general that genetic differentiation (F_{st}) is low, what means genetic variation is more concentrated within rather than among populations, and gene flow among populations is high (Elshibli and Korpelainen, 2008; Martins-Corder et al., 2009; Shapcott et al., 2009; Namoff et al., 2011; Silva et al., 2011; Giovino

et al., 2014; Nazareno and Reis, 2014; Oliveira et al., 2014; Moura et al., 2015). Recently, Ramos et al. (2016) found high level of genetic diversity, mostly within populations, for adults and offspring in populations of *A. aculeatum*, and along with results for spatial genetic structure indicated short-distance seed dispersal and moderate pollen flow. To date, there is no information regarding the level and distribution of genetic diversity for *A. murumuru* and *A. paramaca*, which is needed to evaluate the potential of them as potential crop species. Here, we present molecular genetic data to evaluate the level and distribution of genetic diversity within and among natural populations of *A. aculeatum*, *A. murumuru* and *A. paramaca*.

MATERIAL AND METHODS

Study species, sampling sites and plant material

Astrocaryum aculeatum is a large palm growing up to 35 m, *A. murumuru* is classified as a stemmed palm with a height up to 10 m, and *A. paramaca* is an acaulescent species, (Kahn, 2008). Both *A. aculeatum* and *A. paramaca* have single stem habit, whereas *A. murumuru* is multi-stemmed. All three species are monoecious, perennial, produce fleshy fruits containing a single seed and their inflorescences are composed of separate male and female flowers distributed in dyads and triads (Kahn, 2008). The mating system of *A. aculeatum* was classified as outcrossing (Ramos et al., 2011). To date there is no information on the mating system of the other two species studied here. All three species have tropical distribution with common occurrence in Brazil, Guyana and Suriname. *Astrocaryum murumuru* and *A. paramaca* are also found in French Guiana, while *A. aculeatum* occur in Bolivia, Trinidad and Venezuela

(Kahn, 2008). In Brazil, these species are restricted to the Amazon region, in the northern part of the country (Leitman et al., 2016). Only *A. aculeatum* and *A. murumuru* have economic importance in the Amazon region, the first due to its edible fruits largely consumed in Amazonas state, and the second for its oil utilized in the national cosmetic industry (Clement et al., 2005).

We carried out sampling expeditions in three municipalities for *A. aculeatum* – Belterra (2° 41' 54" South and 54° 53' 18" West, 146m above sea), Tapajós National Forest, in Santarém (2° 26' 22" South and 54° 41' 55" West, 43m above sea) and Terra Santa (2° 6' 16" South and 56° 29' 15" West, 19m above sea) – and two for both *A. murumuru* – Cotijuba Island (1° 13' 04" South and 48° 32' 44" West, 10m above sea) in Belém and Santo Antônio do Tauá (1° 9' 9" South and 48° 7' 45" West, 24m above sea) – and *A. paramaca* – Experimental fields located in Belém (1° 27' 18" South 48° 30' 9" West, 6m above sea) and Ananindeua (1° 21' 59" South and 48° 22' 20" West, 2m above sea) – all in Pará State, Brazil (Figure 1). According to Köppen's classification, climate in Belterra, Santarém and Terra Santa is type Ami, Equatorial monsoon, with minimal temperature higher than 18°C and variation of less than 5°C, and annual precipitation of 1820 mm. The climate in Belém, Santo Antônio do Tauá e Ananindeua is classified as Afi, Equatorial rainforest (fully humid), differing from the Ami only in the annual precipitation at ~2800 mm (Kottek et al., 2006).

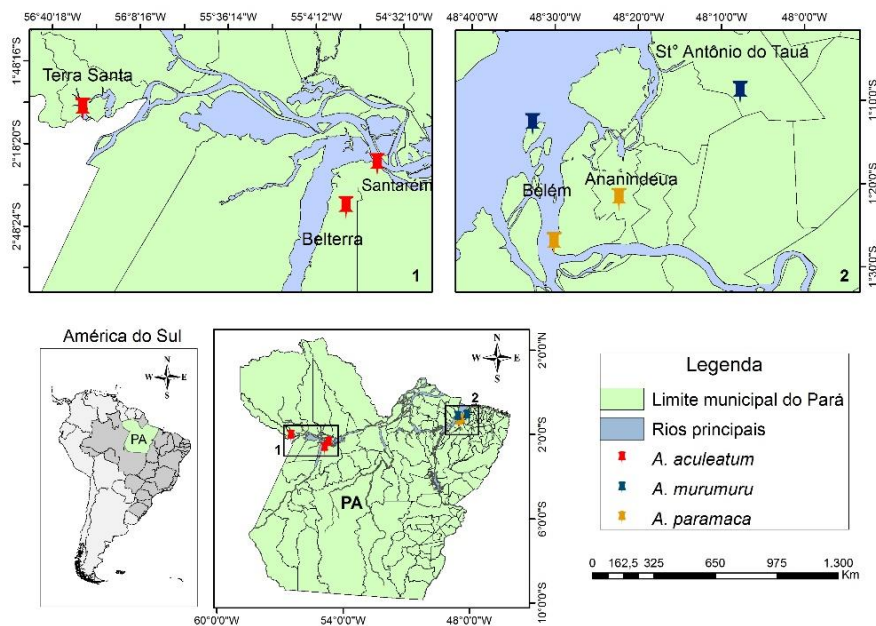


Figure 1. Locations and geographic coordinates of sampling sites of plant material for *Astrocaryum* species in Pará state.

For the genetic diversity and population structure analyses, we collected leaves from a minimum of 20 randomly-chosen adult individuals in each site. Plant material was kept on ice and transported to the Laboratory of Molecular Genetic at EMBRAPA Western Amazon, Belém, Pará, where they were stored at -20°C until DNA extraction.

DNA extraction and PCR reactions

For DNA extraction, leaves stored were cleansed in a 10% sodium hypochlorite solution for approximately 1 min. Total genomic DNA of each individual was extracted using ~100 mg leaf tissue following Costa and Oliveira

(2002). Thirteen microsatellite markers developed by Ramos et al. (2012) were tested and PCR conditions were adapted for duplex and triplex reactions (Table 1). Combinations of multiplexes are shown in Table 1. PCR mix (11 μ L) contained 10ng of total genomic DNA, 1.4X PCR buffer, $MgCl_2$ at 1.5mM, BSA at 0.8 μ g, each dNTP at 200 μ M, forward and M13 labeled primer (NED, FAM and VIC) at 0.16 μ M, reverse primer at 0.32 μ M, 0.4U Taq (5U/ μ L) and milli-Q water to complete final volume. The fragment amplifications were performed using the GeneAmp PCR System 9700 from Applied Biosystems and Mastercycler Ep gradient on Eppendorf thermal cyclers. The PCR programs were composed by two steps. The first step consisted of denaturation (68°C for 2 min and 94°C for 30 s), followed by 30 cycles (30 s at 92°C, 35 s at the primer-combination-specific annealing temperature [Table 1], 30 s at 68°C. The second step consisted of 15 cycles (30 s at 92°C, 30 s at 53°C, 30 s at 72°C) and a final extension at 72°C for 30 min as suggested by Ramos et al. (2012).

After PCR reactions were completed, plates were prepared containing a mix of 0.5 to 2 μ L of three different multiplex products labelled with different dyes, 0.2 μ L Liz 500 size standard and 10 μ L Hi-Di Formamide and submitted to electrophoresis in an automated ABI 3730xl Genetic Analyzer to determine the size of the DNA fragments obtained.

Table 1. Characterization of multiplex sets with primer combinations used for PCR reactions of *Astrocarylum* species.

Multiplex	Locus	Repeat motif	Primer sequences	Ta(°C)
Multiplex 1	Aac01	(ATCACT) 2	F: <FAM>CACATGGTTCCTCCTCGTTC R: GCGAAAGGGTATAGTCAGCG	56
	Aac13	(CA) 7	F: <FAM>CTAGACAACCCAAGAGAGGGG R: TTGGAGAGTGGATGTAGGTGC	
Multiplex 2	Aac03	(TCCTAC) 2	F: <VIC>GCCTCCTTTAGTTCCTGCAC R: AGCATCGGACTTTCCAGGT	56
	Aac11	(AC) 5	F: <VIC>AAAGGAACAACCCAAGAGGG R: TGGGGAGTGGACGTAAGTGT	
Multiplex 3	Aac05	(TACGCT) 2	F: <FAM>GTCCAATTCAGCTCGGCTT R: TTATGCAATGGTGGTGCTGT	58
	Aac06	(TC)19(AC)8	F: <FAM>TCTGATCCATCTGGTTGTCTAA R: TGCATGGTGCTAGAGTAATCC	
Multiplex 4	Aac04	(GT)7(GA)16	F: <VIC>GCATTGTCATCTGCAACCAC R: GCAGGGGCCATAAGTCATAA	54
	Aac14	(CA)6(CG)7 (CA)11(GA)11	F: <VIC>GGCCAGTTGTGTTGATGAAA R: TTAAGCCCCTGGTGAAAACA	
Multiplex 5	Aac02	(GCCATG)2	F: <NED>CGATTTGAGTCCGATGTG R: GCAGTTGTGTGTCTGGTTCT	52
	Aac07	(GT)6	F: <NED>ACTTGTGCTGATACGCACG	

Cont. **Table 1.** Characterization of multiplex sets with primer combinations used for PCR reactions of *Astrocaryum* species.

	Aac10	(CT)7	R: ACCTGGGGATGATGTGTAGC F: <NED>AGCCGTGAGTGAAGTGGCTTT	
Multiplex 6	Aac09	(CT)18	R: AAGCCCAAACCTTCTTCCTCG F: <NED>CAAGCGCCTCCAAGGTAGAT	59
	Aac12	(GC)5(AC)3 AAAC(AG)17	R: GGAAAGAGAAGCAAGGAGTGG F: <NED>GCTCTGTAATCTCGGCTTCCT R: TCCAGTTCAAGCTCTCTCAGC	

Data analyses

For population genetic diversity analyses mean number of alleles per locus (A), mean number of effective alleles (A_e) which is the number of alleles equally frequent needed to obtain the same level of homozygosity found for the real population, percentage of polymorphic loci (A_p), expected heterozygosity (H_e), observed heterozygosity (H_o) and fixation index (F) were estimated. Estimates were obtained for each locus and means for each population and species calculated based on the average over all loci. For population genetic structure analysis, Wright F statistics and gene flow (Nm) were computed. Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was assessed for each locus, in each population, for each species using Chi-Square test. An analysis of molecular variance (AMOVA) among the populations for each species was performed with two hierarchical levels (among and within populations). A principal coordinate analysis (PCoA) was performed among all individuals, for each species, after conversion of the individual-by-individual genetic distance matrix to a covariance matrix and data standardization. When applicable, a Mantel test was conducted to estimate the correlations between genetic and geographic distances. The above analyses were all conducted using the software package GenAlEx v.6.501 (Peakall and Smouse, 2006, 2012).

The assignment of genotypes to genetic clusters for each species was assessed by a Bayesian cluster analysis using Structure 2.3.3 software (Pritchard et al. 2000). Structure identifies genetic clusters and assigns genotypes to those clusters without a priori information on their geographical origin. Both the admixture model and the independent allele model were run. Following a burn-in period of 100,000 runs, ten independent runs were carried out for each value

of K (from 1 to 7) with 100,000 repeats. The choice of the most likely number of clusters (K) was carried out by calculating the statistics ΔK , which is based on the rate of change in the log probability of the data between successive K values, as described by Evanno et al. (2005) using Structure Harvester (Earl and von Holdt, 2011). Among the 10 runs per K , the one with the highest maximum likelihood was used to assign individual genotypes to clusters.

RESULTS

Genetic diversity

Eight of the thirteen primers tested produced reliable peaks allowing their fragment sizing. Considering all three species together, most primers were polymorphic. The most polymorphic primers, across all populations of the three species, were Aac04, Aac06 and Aac12 (Table 2). However, one (Aac13) was monomorphic across all species and two were monomorphic in some species (Aac02 in *A. aculeatum* and *A. murumuru*; Aac11 in *A. paramaca*). Total number of alleles varied among species, ranging from 18 in populations of *A. paramaca* to 24 for *A. aculeatum*.

The average number of polymorphic loci (A_p), for all three species, varied from 62.5% for *A. aculeatum* to 75% found for *A. murumuru* (Table 3). Mean number of alleles (A) ranged from 1.75 to 2.88 and number of effective alleles (A_e) ranged from 1.32 to 1.85, all these values found for populations 1 and 2 of *A. aculeatum*, respectively. When the average among populations within species are considered, *A. aculeatum* and *A. murumuru* showed the highest, and similar, estimates for both mean number of alleles and number of effective alleles (Table 3).

Table 2. Comparison of number of alleles found per locus for the genetic diversity analysis of three *Astrocaryum* species.

Species	N	Aac01	Aac02	Aac03	Aac04	Aac06	Aac11	Aac12	Aac13	Total
<i>A. aculeatum</i>	80	1	1	3	7	6	2	3	1	24
<i>A. murumuru</i>	60	2	1	2	3	5	3	5	1	22
<i>A. paramaca</i>	60	2	2	2	4	3	1	3	1	18

N is the number of individuals sampled per species.

Table 3. Mean estimates of genetic diversity parameters and fixation index (F) estimated over eight loci (standard deviation) for adult individuals from natural populations of three species of *Astrocaryum*.

Species/Pop	N	A	A_e	A_p (%)	H_e	H_o	F (SD)
<i>A. aculeatum</i>							
Belterra	27	2.875	1.852	62.5	0.313	0.239	0.149 (0.133)
Santarém	19	1.750	1.322	62.5	0.175	0.185	0.163 (0.194)
Terra Santa	30	2.375	1.369	62.5	0.179	0.221	-0.139 (0.083)
Mean	25.333	2.333	1.514	62.5	0.222	0.215	0.058
SD	1.013	0.322	0.159	0	0.052	0.055	0.082
<i>A. paramaca</i>							
Belém	28.625	2.125	1.500	75	0.244	0.291	-0.123 (0.061)
Ananindeua	30	2.000	1.453	62.5	0.206	0.279	-0.154 (0.145)
Mean	29.313	2.063	1.477	68.75	0.225	0.285	-0.137

Cont. **Table 3.** Mean estimates of genetic diversity parameters and fixation index (F) estimated over eight loci for adult individuals from natural populations of three species of *Astrocaryum*.

	SD	0.198	0.232	0.164	6.25	0.060	0.086	0.072
<i>A. murumuru</i>								
Cotijuba Island	27.375	2.500	1.568	75	0.239	0.178	0.132 (0.130)	
St ^o . Ant. do Tauá	30.375	2.250	1.542	75	0.269	0.272	-0.060 (0.124)	
Mean	28.875	2.375	1.555	75	0.254	0.225	0.036	
SD	0.576	0.287	0.182	0	0.062	0.060	0.089	

N is the mean number of adult individuals used for parameters estimation; A is the mean number of alleles per locus; A_e the mean number of effective alleles; A_p is the average percentage of polymorphic loci; H_e is the mean expected heterozygosity; H_o is the mean observed heterozygosity; and F is the average of fixation index (standard error for each population) and calculated as $F= 1-(H_o/H_e)$, representing the mean within-population inbreeding.

Estimates of observed and expected heterozygosity were higher for populations 1 of *A. paramaca* and *A. aculeatum*, respectively. The mean observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) were higher for *A. paramaca* with 0.285 and *A. murumuru* with 0.254, respectively (Table 3). Populations 2 and 3 of *A. aculeatum*, 1 and 2 of *A. paramaca* and population 2 of *A. murumuru* showed values of observed heterozygosity higher than the expected. Fixation index (F), equivalent to F_{IS} , varied from positive and negative among populations, being statistically different from zero for populations 1 and 3 of *A. aculeatum*, populations 1 and 2 of *A. paramaca* and population 2 of *A. murumuru*. When means for species are considered only *A. paramaca* showed a negative fixation index, significantly different from zero, suggesting a tendency for excess of heterozygotes and that other species did not statistically deviate from Hardy-Weinberg equilibrium (Table 3).

Genetic structure and gene flow

Mean values for Wright's F-statistics provide insight into the distribution of genetic variation from individuals to among populations (Table 4). The mean reduction of heterozygosity within individuals in a subpopulation, F_{IS} , due to non-random mating. F_{IS} is negative and statistically different from zero only for populations of *A. paramaca*, indicating an excess of heterozygotes. Our relatively low estimates of F_{ST} for all three species examined indicates that populations are not differentiated genetically.

In fact, both Wright's inbreeding coefficient and AMOVA for *A. paramaca* pointed to genetic differentiation among populations of only 1%. *Astrocaryum aculeatum* and *A. murumuru* showed higher percentages of genetic

differentiation among populations with AMOVA (Table 4). Estimates of gene flow (N_m) varied significantly among species, ranging from 2.57 for *A. aculeatum* to 19.35 in *A. paramaca*, suggesting a high level of migration, constituted of pollen and seed dispersal, for *A. paramaca*. The low level of gene flow found especially for *A. aculeatum* helps explain the higher degree of genetic differentiation among populations for this species (Table 4).

Table 4. Estimates of Wright's F statistics, N_m and partitioning of genetic variation (standard deviation) across the eight microsatellite loci for three species of *Astrocaryum*.

Statistic	Species		
	<i>A. aculeatum</i>	<i>A. murumuru</i>	<i>A. paramaca</i>
F_{IS}	0.029 (0.115)	0.033 (0.123)	-0.144 (0.089)
F_{IT}	0.107 (0.114)	0.065 (0.131)	-0.130 (0.090)
F_{ST}	0.089 (0.014)	0.053 (0.031)	0.013 (0.007)
N_m	2.569	4.446	19.351
<i>AMOVA</i>			
Variation among pop	19%	13%	1%
Variation within pop	81%	87%	99%

F_{IS} is the inbreeding coefficient calculated within populations; F_{IT} is the overall inbreeding coefficient relative to the total sample; F_{ST} is the genetic differentiation among populations; N_m estimates the proportion of migrants entering a population per generation. The results of the AMOVA are percentages based on 999 permutations.

The Bayesian analysis on Structure 2.3.3 assigned genotypes to two populations only ($K = 2$), for all three species analyzed of *Astrocaryum* (Figure 2). In the case of *A. aculeatum* (Figure 2A) the number of genetic clusters found (K) was lower than the number of sampled populations, which suggests that populations may reflect a common evolutionary lineage (i.e. subdivision from a single large population) or historically high levels of gene flow. The occurrence of genotype admixture is also noted for populations of *A. murumuru* and *A.*

paramaca (Figure 2B and 2C, respectively), with *A. paramaca* individuals sharing around 50% of their genomes. This result can be explained by the high gene flow among populations in the genetic structure analysis for this species (Table 4).

According to the PCoA analysis performed for *A. aculeatum*, the first principal coordinate explained 72.41% of the genetic variance, and the second principal coordinate explained 27.59%, totalizing together 100% of the genetic variance, and population 3, Terra Santa, was more genetically divergent from the other two populations (Figure 3).

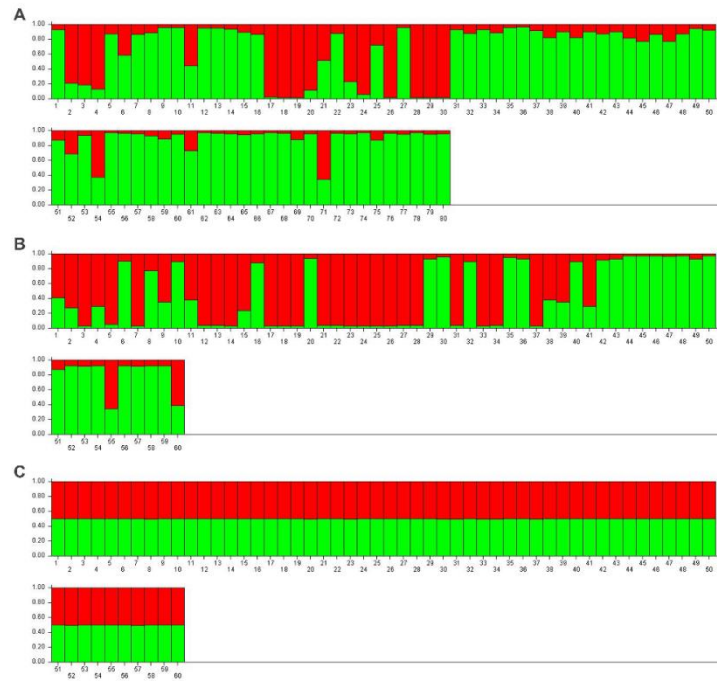


Figure 2. Assignment of samples of three *Astrocaryum* species by Structure version 2.3.3. Each individual bar represents a different genotype. A: *A. aculeatum*; B: *A. murumuru*; C: *A. paramaca*.

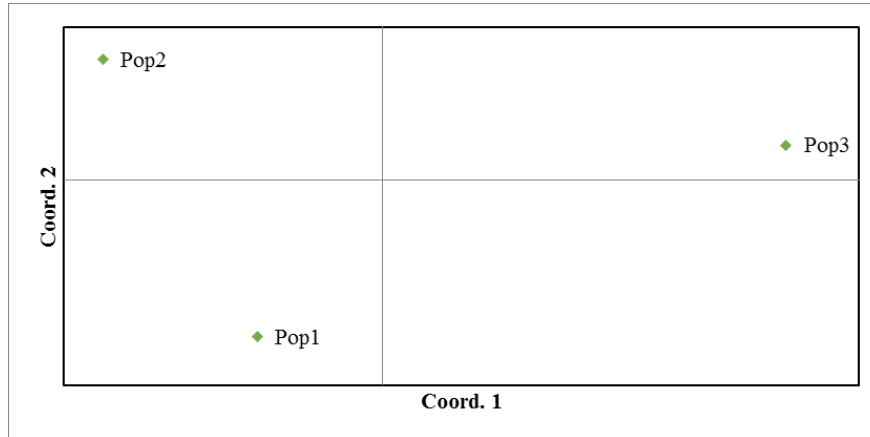


Figure 3. Principal coordinate analysis of the three populations of *Astrocaryum aculeatum*.

The Mantel test for three populations of *A. aculeatum* suggests that isolation by distance can influence the genetic divergence among the populations sampled (Figure 4).

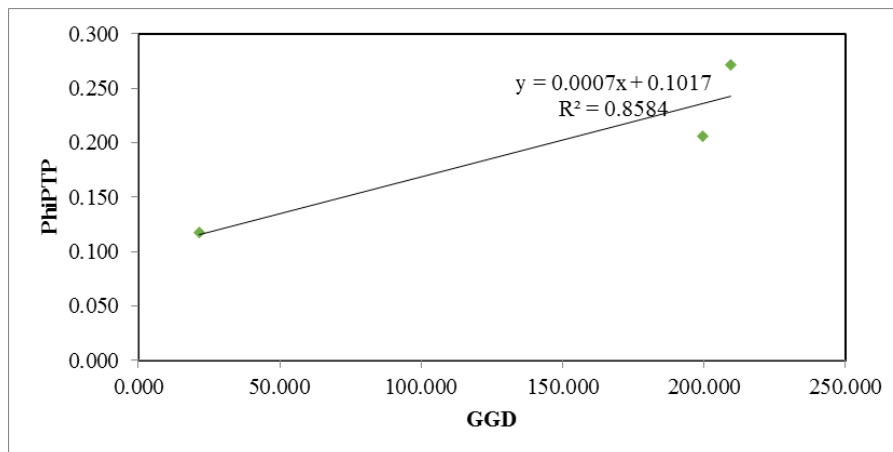


Figure 4. Mantel test for correlation between genetic distance (PhiPTP) and geographic distance (GGD) for populations of *Astrocaryum aculeatum*.

The test for Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) suggests the occurrence of assortative mating, especially in *A. paramaca* populations. The Chi-square test values for populations of the three species studied are shown in Table 5. Significant deviation from HWE was found for three loci, Aac04 in populations 1 and 2 of *A. aculeatum* and populations 2 of *A. murumuru* and *A. paramaca*; Aac06 deviated from HWE in populations 1 and 2 of *A. aculeatum* and in population 1 of *A. murumuru* and population 2 of *A. paramaca*; and Aac12 deviated from HWE in population 3 of *A. aculeatum* and in both populations of *A. murumuru* and *A. paramaca*.

Table 5. Chi-square test for Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) in populations sampled of three *Astrocaryum* species.

Species	<i>A. aculeatum</i>				<i>A. murumuru</i>			<i>A. paramaca</i>		
	Locus	Population	DF	X ²	P	DF	X ²	P	DF	X ²
Aac01	1			Monomorphic	1	0.040	0.842 ^{ns}	1	0.159	0.690 ^{ns}
	2			Monomorphic	1	0.502	0.479 ^{ns}	1	0.083	0.773 ^{ns}
	3			Monomorphic		-			-	
Aac02	1			Monomorphic		Monomorphic		1	0.386	0.534 ^{ns}
	2			Monomorphic		Monomorphic			Monomorphic	
	3			Monomorphic		-			-	
Aac03	1	3	1.673	0.643 ^{ns}	1	0.269	0.604 ^{ns}	1	0.386	0.534 ^{ns}
	2	1	1.351	0.245 ^{ns}	1	0.894	0.344 ^{ns}	1	0.710	0.399 ^{ns}
	3	1	0.009	0.926 ^{ns}		-			-	
Aac04	1	21	62.517	0.000 ^{***}	3	3.211	0.360 ^{ns}	3	5.885	0.117 ^{ns}
	2	1	3.951	0.047 [*]	1	10.782	0.001 ^{**}	10	13.310	0.038 [*]
	3	10	5.019	0.890 ^{ns}		-			-	
Aac06	1	10	47.654	0.000 ^{***}	10	24.155	0.000 ^{***}	3	6.508	0.089 ^{ns}
	2	1	20.000	0.000 ^{***}	6	1.904	0.928 ^{ns}	1	6.467	0.011 [*]
	3	6	0.710	0.994 ^{ns}		-			-	
Aac11	1	1	0.778	0.378 ^{ns}	3	0.042	0.998 ^{ns}		Monomorphic	
	2	1	0.263	0.608 ^{ns}	1	0.034	0.853 ^{ns}		Monomorphic	
	3	1	0.009	0.926 ^{ns}		-			-	

Cont. **Table 5.** Chi-square test for Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) in populations sampled of three *Astrocaryum* species.

Aac12	1	3	2.685	0.443 ^{ns}	6	35.712	0.000 ^{***}	3	8.019	0.046 [*]
	2	3	3.230	0.358 ^{ns}	6	37.275	0.000 ^{***}	3	34.269	0.000 ^{***}
	3	3	25.315	0.000 ^{***}	-	-	-	-	-	-

For *A. aculeatum* – Population 1: Belterra; Population 2: Tapajós National Forest; Population 3: Terra Santa. For *A. murumuru* – Population 1: Ilha das Onças; Population 2: Santo Antônio do Tauá. For *A. paramaca* – Population 1: Belém; Population 2: Ananindeua. DF is the degree of freedom; X^2 is the chi-square estimate; P is the probability; ^{ns} means not significantly different from HWE; ^{*} significantly different from HWE at p <0.05; ^{**} significantly different from HWE at p <0.01; and ^{***} significantly different from HWE at p <0.001

DISCUSSION

Number of alleles per locus found for the populations of *A. aculeatum* and *A. murumuru* species differed from that published by Ramos et al. (2012) (Table 6). For *A. aculeatum* we found more monomorphic loci while for *A. murumuru* our study found more polymorphism than the previous report, likely because our sample size was much higher. This is the first report for *A. paramaca* and the number of alleles were similar to that of *A. murumuru* found in our study. In addition, samples from the two studies were collected in different states and it is worth noting that some unique alleles for some loci (e.g. Aac01, Aac02 and Aac04) were found for *A. aculeatum*. The occurrence of these private alleles and the higher level of polymorphism is to be expected because our study included more sampling sites, greater number of individuals/site, and a greater geographic extent sampled.

Percentage of polymorphic loci we found for the three *Astrocaryum* species is lower than those reported by most other studies involving other palm species using SSR, where all loci tested were polymorphic (Conte et al., 2008; Elshibli and Korpelainen, 2008; Choo et al., 2010; Namoff et al., 2011; Ottewell et al., 2012; Giovino et al., 2014; Lanes et al., 2015; Nazareno and Reis, 2014; Moura et al., 2015). An extremely low value of polymorphism (6.17%) was reported for *Livistona carinensis*, an endangered palm species (Shapcott et al., 2009). However, given the wide geographic distribution of the palm species investigated in our study, we would have expected higher levels of polymorphism. Wider geographic sampling is necessary to determine species level of polymorphism for *A. aculeatum*, *A. murumuru* and *A. paramaca*.

Table 6. Comparison of number of alleles and allele size per locus found for *Astrocaryum* species by Ramos et al. (2012) and in the present study. Allele ranges (bp) are given in parenthesis.

Locus	<i>A. aculeatum</i>	<i>A. murumuru</i>	<i>A. aculeatum</i>	<i>A. murumuru</i>	<i>A. paramaca</i>
	Ramos et al. 2012			Present study	
Aac01	2 (332-362)	1 (338)	1 (354)	2 (339-354)	2 (342-354)
Aac02	2 (282-342)	1 (291)	1 (306)	1 (306)	2 (298-306)
Aac03	3 (137-167)	1 (145)	3 (157-181)	2 (157-162)	2 (157-162)
Aac04	6 (212-242)	4 (207-227)	7 (207-274)	3 (228-258)	4 (231-263)
Aac06	8 (132-192)	5 (142-162)	6 (141-196)	5 (134-197)	3 (143-156)
Aac11	2 (202-228)	1 (205)	2 (201-223)	3 (215-252)	1 (221)
Aac12	5 (167-181)	4 (158-178)	3 (163-195)	5 (172-205)	3 (179-195)
Aac13	3 (182-202)	2 (182-206)	1 (204)	1 (204)	1 (204)
N	40	4	80	60	60

N is the total number of individuals sampled.

Levels of genetic diversity (H_e and H_o) found for the species of *Astrocaryum* presented here were also lower than most of the literature available for other palm species using microsatellite markers, which showed a minimum estimate for expected heterozygosity of 0.5 (Conte et al., 2008; Elshibli and Korpelainen, 2008; Choo et al., 2010; Namoff et al., 2011; Ottewell et al., 2012; Nazareno and Reis, 2014; Moura et al., 2015; Ramos et al., 2016). Nevertheless, similar results for H_e and H_o were found for *Chamaerops humilis*, with mean number of alleles equal to 3.67 and expected and observed heterozygosity equal to 0.374 and 0.366, respectively (for Giovino et al., 2014). It is worth mentioning that studies with other congeners of *Astrocaryum* (Ramos et al., 2012, 2016; Oliveira et al., 2014) that used the same microsatellite set used here, excluded monomorphic loci from the estimation of genetic diversity. This automatically increased the estimates for these parameters (given the formula used to calculate heterozygosity ($H = 1 - \sum_{i=1}^m p^2$)). Genetic diversity is dependent on the number of alleles and the evenness of their frequencies. In fact, Conte et al. (2003) demonstrated that considering only polymorphic loci in the estimation of genetic diversity parameters drastically affects their values. If we considered only polymorphic loci our H_e and H_o estimates would be those presented in Table 7 what represents an increase of ~60% for *A. aculeatum* and ~33% for *A. murumuru* and *A. paramaca*.

Table 7. Means for number of alleles (A), effective alleles (A_e), and expected and observed heterozygosity (H_e and H_o) for *Astrocaryum* species when only polymorphic loci are considered.

Species	A	A_e	H_e	H_o
<i>A. aculeatum</i>	3.13 (0.39)	1.82 (0.22)	0.36 (0.06)	0.34 (0.07)
<i>A. murumuru</i>	2.83 (0.27)	1.74 (0.22)	0.34 (0.07)	0.30 (0.07)
<i>A. paramaca</i>	2.42 (0.23)	1.64 (0.20)	0.30 (0.07)	0.38 (0.10)

Standard deviations are showed in parenthesis.

If the low levels of genetic diversity exhibited in the studied species are a result of stochastic events, such as genetic drift, population bottlenecks or inbreeding, we would expect to find a higher proportion of homozygotes with positive values for F_{IS} (*sensu* Namoff et al., 2011). However, fixation index and Wright's inbreeding coefficients suggests an excess of heterozygotes for *A. paramaca*. Other studies conducted with palm species also found a tendency for higher proportion of heterozygotes within populations (Conte et al., 2003; Elshibli and Korpelainen, 2008). This could be the result of early-acting inbreeding depression mechanisms. A study with *Vaccinium corymbosum* (Ericaceae) found that heterozygosity increases due to the abortion of most self-fertilized seeds, a post-zygotic mechanism of high inbreeding depression (Krebs and Hancock, 1990). In a review, Husband and Schemske (1996) found general support for the theoretical prediction that for outcrossing species inbreeding depression tend to be expressed at early life stages. Although, there is no information on the mating system of *A. murumuru* and *A. paramaca*, close relatives, including *A. mexicanum* (Eguiarte et al., 1992) and *A. aculeatum*, are outcrossing (Ramos et al., 2011), and unpublished data (Padilha de Oliveira) indicate that *A. vulgare* is outcrossing as well. Given the life history, floral and ecological traits shared by *A. murumuru* and *A. paramaca* with *A. vulgare*, it is likely that they are all outcrossing.

According to our estimates of F_{ST} and AMOVA, most of the genetic variation is found within populations for all three species of *Astrocaryum*, following expectation for woody species (Hamrick et al., 1992). Nevertheless, genetic differentiation among *A. aculeatum* populations were significantly higher than for the other two species (Figure 1) likely explained by the greater

distance between samples sites for *A. aculeatum*. Estimated gene flow for this species was much lower than for *A. murumuru* and *A. paramaca*. Similar results for *A. aculeatum* (Namoff et al., 2011) with percentage of genetic variation within and among population of 83.96 and 16.04, respectively. Even higher genetic differentiation among populations were found for *Oenocarpus mapora* (~36%), suggesting small sample sizes within populations as one possible factor to explain such variation (Moura et al. 2015).

CONCLUSIONS

Most of the genetic variation within the economically important palm species, *Astrocaryum aculeatum*, *A. murumuru* and *A. paramaca*, is found within populations. This result is expected given their life history, floral and ecological traits. Low levels of inbreeding occur for these species, with proportion of heterozygotes being higher than expected by Hardy-Weinberg equilibrium in *A. paramaca*. Genetic differentiation among populations is strong correlated to geographic distance, with gene flow between distant populations being probably restricted by low levels of animal-mediated seed dispersal and pollen flow.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful for the assistance provided by staff of the Embrapa Eastern Amazon and University of Pittsburgh. We also would like to thank FINEP for funding the project “Pesquisa Desenvolvimento e Inovação (PD&I) em palmáceas para a produção de óleo e aproveitamento ecocômico de coprodutos e resíduos – 01.10.0343.00 Propalma – and CAPES for granting the first author a scholarship – Process [99999.001326/2014-07](#).

REFERENCES

- Booy G, Hendriks RJJ, Smulders MJM, Van Groenendael JM, Vosman B, et al. (2000). Genetic diversity and the survival of populations. *Plant Biology* 2(4): 379-395. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2000-5958>
- Choo J, Ishak H, Simpson B, Mueller U, Juenger T, et al. (2010). Characterization of 14 microsatellite loci in a tropical palm, *Attalea phalerata* (Arecaceae). *American Journal of Botany* 99: 105-106. <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.1000281>
- Clement CR, Lleras Pérez E and Van Leeuwen J. (2005). O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. *Agrociências* 9: 67-71.
- Conte R, Nodari RO, Vencovsky R, Reis MS, et al. (2003). Genetic diversity and recruitment of the tropical palm, *Euterpe edulis* Mart., in a natural population from the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity* 91(1-2): 401-406. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.hdy.6800347>
- Conte R, Reis MS, Mantovani A, Vencovsky R, et al. (2008). Genetic structure and mating system of *Euterpe edulis* Mart. populations: A comparative analysis using microsatellite and allozyme markers. *Journal of Heredity* 99(5): 476-482. <http://dx.doi.org/10.1093/jhered/esn055>
- Costa MR and Oliveira MSP. (2002). Extração de DNA de açazeiro a partir de folhas. *Documentos*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, n.127, p. 1-22. 2002.
- Dransfield J, Uhl NW, Asmussen CB, Baker WJ, Harley MM, Lewis CE, et al. (2008). *Genera Palmarum: the evolution and classification of palms*. Kew Publishing, Royal Botanical Garden, Londres. 732p.
- Earl DA and Von Holdt BM. (2011). STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359-361. <http://dx.doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>

- Eguiarte LE, Perez-Nasser N and Piñero D. (1992). Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): Implications for evolution and conservation. *Heredity* 69: 217-228. <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.1992.119>
- Elshibli S and Korpelainen H. (2008). Microsatellite markers reveal high genetic diversity in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) germoplasm from Sudan. *Genetica* 134: 251-260. <http://dx.doi.org/10.1007/s10709-007-9232-8>
- Evanno G, Regnaut S and Goudet S. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-94X.2005.02553.x>
- Ferreira SAN and Gentil DFO. (2006). Extração, embebição e germinação de sementes de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*). *Acta Amazônica* 36(2): 141-146.
- Gaiero P, Mazzella C, Agostini G, Bertolazzi S, Rossato M, et al. (2011). Genetic diversity among endangered Uruguayan populations of *Butia* Becc. species based on ISSR. *Plant Systematics and Evolution* 292: 105-116. <http://dx.doi.org/10.1007/s00606-010-0412-0>
- Giovino A, Scibetta S, Saia S, Guarino C, et al. (2014). Genetic and morphologic diversity of European fan palm (*Chamaerops humilis* L.) populations from different environments from Sicily. *Botanical Journal of the Linnean Society* 176: 66-81. <http://dx.doi.org/10.1111/boj.12195>
- Gomes LRP, Lopes MTG, Bentes JLS, Barros WS, Costa Neto PQ, Contim LAS, et al. (2011). Genetic diversity in natural populations of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.). *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 11: 216-223. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-70332011000300003>
- Hamrick JL, Godt MJW and Sherman-Broyles SL. (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New forests* 6: 95-124.
- Husband BC and Schemske DW. (1996). Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution* 50(1): 54-70. <http://dx.doi.org/10.2307/2410780>
- Kahn, F. (2008). The genus *Astrocaryum*. *Revista Peruana de Biología* 15(1): 31-48.

Kottek M, Grieser J, Beck C, Rudolf B, Rubel F, et al. (2006). World-map of Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift* 15(3): 259-263. <http://dx.doi.org/10.1127/0941-2948/2006/0130>

Krebs SL and Hancock JF. (1990). Early-acting inbreeding depression and reproductive success in the highbush blueberry, *Vaccinium corymbosum* L. *Theoretical and Applied Genetics* 79(6): 825-832. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00224252>

Lanes ECM, Motoike SY, Kuki KN, Nick C, Freitas RD, et al. (2015). Molecular characterization and population structure of the Macaw Palm, *Acrocomia aculeata* (Arcaceae), *ex situ* Germplasm collection using microsatellites markers. *Journal of heredity* 106(1): 102-112. <http://dx.doi.org/10.1093/jhered/esu073>

Leitman P, Soares K, Henderson A, Noblick L, Martins RC, et al. (2015). *Arecaceae* in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available in: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22080>>. Access on: 17 Ago. 2016.

Macêdo JLV de, Ramos SLF, Lopes MTG, Costa JR da, Leeuwen JV, Lima RMB de, Silva PP da, et al. (2015). *Tucumã-do-amazonas*. In: Lopes R, oliveira M do SP de, Cavallari MM, Barbieri RL, Conceição LDHCS da S. Palmeiras nativas do Brasil. Belém, cap. 12, 371-393 p. 2015.

Martins-Corder MP, Fialho LEB, Zambiasi DC, Konzen ER, et al. (2009). Análise da diversidade genética de populações de palmitero (*Euterpe edulis* MARTIUS) através de marcadores isoenzimáticos. *Revista Ceres* 56(2): 204-213.

Meerow AW, Wisser RJ, Brown JS, Kuhn DN, Schnell RJ, Broschat TK, et al. (2003). Analysis of genetic diversity and population structure within Florida coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm using microsatellite DNA, with special emphasis on the Fiji Dwarf cultivar. *Theoretical Applied Genetics* 106: 715-726. <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-002-1121-z>

Mondini L, Noorani A and Pagnotta MA. (2009). Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity* 1: 19-35. <http://dx.doi.org/10.3390/d1010019>

Namoff S, Veloz A, Jiménez F, Rodríguez-Peña RA, Peguero B, Lewis C, Moynihan J, Abdo M, Maunder M, Wettberg EV, Meerow AW, Griffith MP, Francisco-Ortega J, et al. (2011). Sweet drinks are made of this: Conservation genetics of an endemic palm species from the Dominican Republic. *Journal of Heredity* 102(1): 1-10. 2011. <http://dx.doi.org/10.1093/jhered/esq118>

Nazareno AG and Reis MS. (2014). At risk of population decline? An ecological and genetic approach to the threatened palm species *Butia eriospatha* (Arecaceae) of Southern Brazil. *Journal of Heredity* 105(1): 120-129. <http://dx.doi.org/10.1093/jhered/est065>

Oliveira LDS, Ramos SLF, Lopes MTG, Dequigiovanni G, Veasey EA, Macêdo JLV, Batista JS, Formiga KM, Lopes R, et al. (2014). Genetic diversity and structure of *Astrocaryum jauari* (Mart.) palm in two Amazon river basins. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 14: 166-173. <http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332014v14n3a25>

Ottewell K, Grey E, Castillo F, Karubian J, et al. (2012). The pollen dispersal kernel and mating system of an insect-pollinated tropical palm, *Oenocarpus bataua*. *Heredity* 109: 332-339. <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.2012.40>

Peakall R and Smouse PE. (2006). GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology* 6: 288-295. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>

Peakall R and Smouse PE. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, v. 28, p. 2537-2539. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>

Pritchard JK, Stephens M and Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.

Ramos SLF, Lopes MTG, Lopes R, Cunha RNV, Macêdo JLV, Contim LAS, Clement CR, Rodrigues DP, Bernardes LG, et al. (2011). Determination of the mating system of Tucumã palm using microsatellite markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 11: 181-185. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-70332011000200011>

Ramos SLF, Macêdo JLV, Lopes MTG, Batista JS, Formiga KM, Silva PP, Saulo-Machado AC, Veasey EA, et al. (2012). Microsatellite loci for tucumã of Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) and amplification in other Arecaceae. *American Journal of Botany* 99: 508-510. <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.1100607>

Ramos SLF, Dequigiovanni G, Sebbenn AM, Lopes MTG, Kageyama PY, Macêdo JLV, Kirst M, Veasy EA, et al. (2016). Spatial genetic structure, genetic diversity and pollen dispersal in a harvested population of *Astrocaryum aculeatum* in the Brazilian Amazon. *BMC Genetics* 17(1): 1-10. <http://dx.doi.org/10.1186/s12863-016-0371-8>

Shapcott, A. (1998). The patterns of genetic diversity in *Carpentaria acuminata* (Arecaceae), and rainforest history in northern Australia. *Molecular Ecology* 7: 833-847. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00398.x>

Shapcott, A. (1999). Comparison of the population genetics and densities of five *Pinanga* palm species at Kuala Belalong, Brunei. *Molecular Ecology* 8: 1641-1654. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00749.x>

Shapcott A, Dowe JL and Ford H. (2009). Low genetic diversity and recovery implications of the vulnerable Bankoualé palm *Livistona carinensis* (Arecaceae), from North-eastern Africa and the Southern Arabian Peninsula. *Conservation Genetics* 10: 317-327. <http://dx.doi.org/10.1007/s10592-008-9582-5>

Silva MS, Vieira FA and Carvalho D. (2011). Diversity and genetic structure in natural populations of *Geonoma schottiana* Mart. (Arecaceae): Implications for conservation. *Cerne* 17(2): 195-201. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-77602011000200006>

Artigo 2

**Karyological differentiation of four species of *Astrocaryum* G. Mey.
(Areaceae)**

Formatado de acordo com a revista Australian Journal of Botany, à qual o artigo foi submetido.

**Karyological differentiation of four species of *Astrocaryum* G. Mey.
(Arecaceae)**

N. P. de OLIVEIRA^{A,D}, R. CHIAVEGATTO^B, L. C. ROCHA^A, Y. DUTRA^A, M.
S. P. de OLIVEIRA^C, L. C. DAVIDE^A

A: Departamento de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, Brasil.

B: Departamento de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, Brasil.

C: Embrapa Amazônia Oriental, CPATU, Belém, PA, Brasil.

D: Autor para correspondência. Email: naty_poliveira@hotmail.com

Abstract. The *Astrocaryum* genus comprises 40 species, most of them widely used by the Amazon population, especially in culinary, as remedy and oil production, and some with great potential to the Brazilian economy. Nevertheless, to date no information has been provided on the cytogenetic characteristics of these species. The aim of this work was to characterize and compare the type of interphase nuclei, chromosome set for morphology, fluorochrome banding and *in situ* hybridization of *Astrocaryum aculeatum* G. Mey, *Astrocaryum murumuru* Mart., *Astrocaryum paramaca* Mart., and *Astrocaryum vulgare* Mart. In order to do that, cytogenetics analyses consisting of interphase nucleus staining with Giemsa, and fluorochrome staining with CMA and DAPI and *in situ* hybridization using 45S and 5S rDNA sites and telomere sequences, in metaphase chromosomes, were carried out. Karyological data for all species were first relate. The four species presented $2n = 30$ chromosomes, but differences in the karyotypic formula, number and position of CMA⁺ band and 45S site, and position of 5S rDNA site were observed. There was significant difference for total length of haploid set, with a difference of 43% between the smallest (*A. paramaca* – 27,085 μm) and the highest (*A. murumuru* – 47,486 μm). The karyological data obtained here allow us to recognize species belonging to different subgenera of *Astrocaryum*.

Key words: Karyogram, Fluorochrome banding, Fluorescence *in situ* hybridization, Palms

INTRODUCTION

The Arecaceae Bercht. and J. Presl family comprises around 2400 species distributed among 190 genera and is recognized as one of the most abundant among monocotyledons (Röser 1995; Dransfield et al. 2008). The genus *Astrocaryum* G. Mey. is composed by 40 species, divided in three subgenera *Astrocaryum*, *Munbaca* and *Monogynanthus*, with tropical distribution and largely use by the Amazon population (Kahn, 2008). The species *Astrocaryum aculeatum*, *Astrocaryum murumuru* and *Astrocaryum vulgare* are pointed by Clement et al. (2005) and Kahn (2008) as important genetic resources with economic potential to the Brazilian economy, for their fruit production to food and cosmetic industry, and biofuel production, respectively. In contrast to the large literature available for these species, there is no much information on *Astrocaryum paramaca* (Dransfield et al., 2008; Kahn, 2008). Beyond the economic and social importance of *Astrocaryum* spp., they also stand out as key economic species in the environment where they occur, providing fruits throughout the year (Dransfield et al., 2008).

A recent study on the colonization and diversification patterns of *Astrocaryum* spp. dated the origin of this group to *c.* 36 Mya (Roncal et al., 2013). Besides information available on the phylogeny (e.g. Roncal et al., 2013) and morphological characteristics (Kahn, 2008) taxonomy of *Astrocaryum* remains controversial (Dransfield et al., 2008; Kahn, 2008), e.g. number of species recognized which for Kahn (2008) is 40 species but only 38 of them are accepted for The Plant List website (The Plant List website, 2013).

Classification of species in higher taxonomical levels is also problematic and according to Kahn (2008) this is due to the characteristic chosen to assembly *Astrocaryum* spp.

Cytogenetics is a very useful tool allowing for better understand of species evolution, supporting systematic studies, and also provide additional information to germplasm characterization, as suggesting better combinations for breeding programs (Stace 2000). Furthermore, cytogenetic analyses with heterochromatin distribution and rDNA site localization can help identify large genome changes, such as structural chromosome rearrangements (Castilho et al., 2000) and even chromosome sex identification in plant species (Siljak-Yakovlev et al., 1996), thus being helpful clarifying cases like *Astrocaryum* taxonomy. Most of the studies on palm cytogenetics has focused on the chromosome number and genome size, and for this family such characteristics have proved to be constant or not vary significantly among congener species (Röser 1993, 1994, 1995, 1999; Corrêa et al. 2009). Chromosome number, in Arecaceae varies from $2n = 2x = 26$ up to 36, while nuclear DNA amount (2C) varies from 1.95 up to 27.8 pg, a 14-fold variation (Röser 2000; Röser et al. 1997). Studies with detailed information as interphase nuclei comparison, karyotypes, banding patterns and *in situ* hybridization of rDNA sites has increased in the last decades (Castilho et al. 2000; Abreu et al. 2011; Battistin et al. 2012; Cepeda-Cornejo et al. 2012; Gaiero et al. 2012). To date, no cytological information is available for *Astrocaryum* spp.

This paper aimed to investigate cytological variations among *A. aculeatum*, *A. murumuru*, *A. paramaca* and *A. vulgare* based on the analyses of

the interphase nuclei, chromosome size and morphology, fluorochrome banding (CMA and DAPI), and number and position of 5S and 45S rDNA sites.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

For *A. paramaca*, seeds were collected from two natural populations, in Belém and Ananindeua, both municipalities of Pará state, Brazil. Seeds of *A. aculeatum*, *A. vulgare* and *A. murumuru* were collected from at least five adult individuals kept in the active germplasm collections at Embrapa Western Amazon, in Belém, Pará, Brazil and Embrapa Amapá, in Macapá, Amapá, Brazil, respectively. Seeds were treated for break dormancy according to Ferreira and Gentil (2006) and seedlings were mailed to the Laboratory of Cytogenetics at the Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil, where five to ten individuals of each species were kept in a greenhouse.

Interphase nuclei and chromosome analyses

For interphase nuclei analysis, root tips were collected, fixed in Carnoy solution (3:1, 100% ethanol: glacial acetic acid) and stored at -20°C. Slides were prepared by squashing technique after enzyme digestion for 2-3h at 37°C, with a combination (3:1) of pectinase/cellulase (100/200U), and coverslips were removed by freezing in liquid nitrogen. Slides were stained in 10% Giemsa. A total of 500 interphase nuclei were analyzed per species. Images were digitalized

in a Zeiss Axio Lab A1 microscope equipped with an AxioCam ICc1 camera. Classification of interphase nuclei followed Guerra (1987).

For chromosome analysis, root tips were treated in 2mM 8-hydroxyquinoline for 24h at 4°C, fixed in Carnoy solution and then stored at -20°C. Fixed root tips were washed in distilled water for 15 min, rinsed in buffer (40mM citric acid, 60mM sodium citrate, containing 1% Triton) for 20 min, washed again in distilled water, rinsed in buffer (40mM citric acid, 60mM sodium citrate) and digested for 2-3h at 37°C, with a combination (3:1) of pectinase/cellulase (100/200U) and 5% pectoliase. Slides were prepared according Dong et al. (2006). The best slides were selected for the following cytogenetic techniques.

Chromosome banding and karyotypic analyses

Slides were kept for three days at room temperature and fluorochrome banding with CMA and DAPI followed Guerra and Souza (2010), with minor modifications. After storage of at least three days at 4°C, for fluorochrome stabilization, slides were analyzed under a Nikon Eclipse E400 DMLB epifluorescence microscope connected to a DS-Qi IMc camera for image digitalizing. Five well spread metaphases, with similar condensation level, of each species were used for karyotype construction. For idiograms, chromosome measurements consisting of the short arm (S) and long arm (L) of the chromosome pair, total chromosome pair length (L+S), arm ratio (AR) and centromeric index (CI) according to Levan et al. (1964) were made using the free software KaryoType (Yu et al., 2016) and MicroMeasure 3.3 (Reeves,

2000). Chromosome asymmetry was estimated using methods proposed by Stebbins (1958) and Zarco (1986).

Measurements of CMA⁺ and DAPI^(+/-), were obtained using the free software KaryoType and MicroMeasure. Slides were destained in Carnoy solution for 30 min, dehydrated in 100% ethanol for 2h and stored at 4°C. When possible, the five selected metaphases were used in fluorescence *in situ* hybridization.

Fluorescence in situ hybridization technique

For fluorescent *in situ* hybridization probes pTa 71 from *Triticum aestivum* L. and D2 from *Lotus japonica* (Regel) K. Larsen., were used to localize rDNA 45S and 5S sites, respectively. For telomere detection probe pAtT4 from *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. were used. All three probes were labeled by nick translation technique, using digoxigenin for 45S and telomeric and biotin for 5S probes. Slides were denatured with 70% formamide in 2x SSC for approximately 2 min at 85°C and quickly dehydrated in 70%, 90% and 100% ethanol for 5 min each at -20°C. The hybridization mix, containing 70% formamide, 10% (p/v) dextran sulfate, 2x SSC and 50 ng of each DNA probe, were denatured at 95°C for 8 min and applied over slides which were left for at least 16h at 37°C. A stringent wash was performed in 2x SSC twice, for 5 min at room temperature and 10 min at 4°C, respectively, followed by 5 min in 1x TNT. For probe detection, slides were covered with a solution containing anti-digoxigenin-FITC (fluorescein isothiocyanate) and avidin-TRITC conjugate in TNB buffer and left for 1h at 37°C. Three washes in 1x TNT for 5 min followed

by 5 min in 1x PBS were performed. Chromosomes were counterstained and slides were mounted with DAPI ($2 \mu\text{l.mL}^{-1}$) in Vectashield (Vector Laboratories, CA, USA). Images were digitalized as mentioned before and processed with Adobe photoshop CS6.

RESULTS

Interphase nuclei of the four species analyzed exhibited strongly pigmented chromatin structures with irregular contours, known as chromocenter, being classified as semi-reticulate (Figure 1). The species also displayed the same somatic chromosome number $2n = 30$ and similar karyotypes (Figures 2 and 3). Results only on type of interphase nuclei and chromosome number were not enough to identify the species investigated.

All karyotypes were symmetrical, classified as 2A for Stebbins' classification, with *A. aculeatum* and *A. paramaca* being composed by 11 M + 4 SM, *A. vulgare* formed by 10 M + 5 SM, and *A. murumuru* formed by 9 M + 6 SM (Table 1). Nevertheless, according to the method proposed by Zarco (1986) for estimating chromosome asymmetry, *A. paramaca* was the most symmetric being separated from the other species (Figure 2). *Astrocarym vulgare* was the most asymmetric species, but grouped closely to *A. aculeatum*.

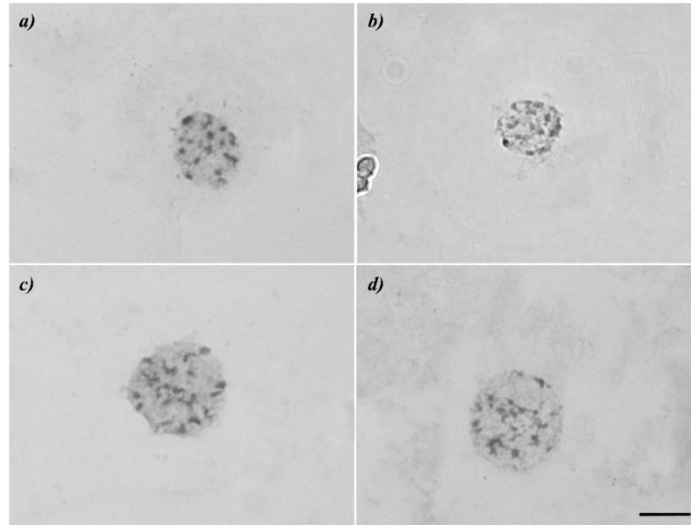


Figure 1. Semi-reticulate interphase nuclei for species *A. aculeatum* (A); *A. paramaca* (B); *A. murumuru* (C); and *A. vulgare* (D). Bar = 10 μm .

Total length of haploid chromosome set was statistically different among species, ranging from 27.085 μm for *A. paracama* to 47.486 μm for *A. murumuru* (Table 1) which consists in a difference of 43%. Chromosome size for each species ranged from 2.080 μm to 3.835 μm in *A. aculeatum*, 2.401 μm to 3.877 μm in *A. murumuru*, 1.287 μm to 2.487 μm in *A. paramaca* and 1.812 μm to 3.205 μm in *A. vulgare*. Morphology of chromosome pairs 1, 6, 11, 12, 13, 14 and 15 were coincident for the four species. Among species, haploid chromosome set of *A. aculeatum* and *A. vulgare*, and *A. murumuru* and *A. vulgare* shared the higher number of chromosome pairs with coincident morphology, 12, followed by *A. murumuru* and *A. paramaca* with 11 pairs (Table 2).

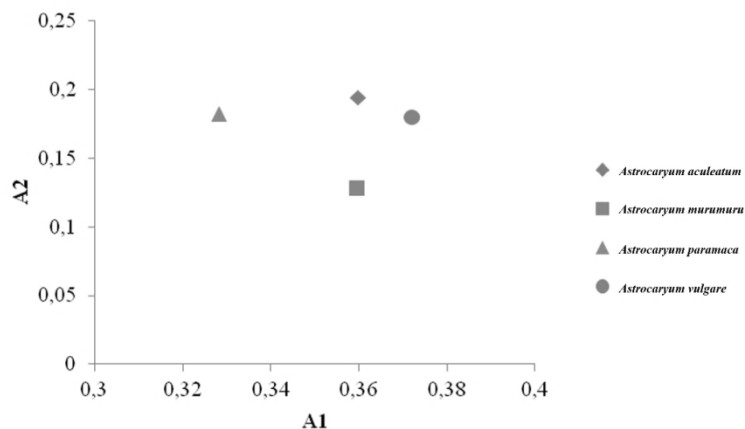


Figure 2. Scatter diagram showing karyotype asymmetry according to Zarco's method. A₁ means intrachromosomal asymmetry index, and A₂ means interchromosomal asymmetry index.

Fluorochrome staining and *in situ* hybridization procedures also revealed difference among species for number and position of CMA⁺/DAPI⁻ bands, and 45S and 5S rDNA sites were located in different chromosome pairs (Figures 3, 4 and 5).

Table 1. Mean values for total length of haploid chromosome set (μm) for the four investigated species of *Astrocarium*.

Metaphase	Species			
	<i>A. aculeatum</i>	<i>A. murumuru</i>	<i>A. paramaca</i>	<i>A. vulgare</i>
1	44.239	52.839	25.537	40.253
2	35.346	47.334	26.464	34.464
3	47.636	45.17	25.343	32.842
4	52.966	50.114	28.648	42.448
5	39.049	41.974	29.435	35.383
Average	43.847 ab	47.486 a	27.085 c	37.078 b

SD

Mean values followed by the same letter do not differ statistically by Tukey's test at 5% probability.

Two pairs of CMA⁺/DAPI⁻ bands were found for *A. murumuru* in chromosomes 4 and 9, while only one pair was found for *A. aculeatum* and *A. vulgare*, in chromosome 13, and in chromosome 4 of *A. paramaca*, respectively, all located in terminal positions of the short arm, except for *A. aculeatum* where it occurred in the long arm. No DAPI⁺ bands were observed for any one of the species. Heteromorphism for band and/or chromosome size was observed for all chromosome pairs with CMA⁺/DAPI⁻, being clearly noted for *A. paramaca* (Figures 3 and 4). For *A. aculeatum*, CMA⁺ bands were 0.64 and 0.77, with total chromosome length of 3.02 and 2.94, respectively. For *A. murumuru*, first chromosome pair showed CMA band size of 0.57 and 0.58, with total chromosome length of 4.11 and 5.41, respectively, and second chromosome pair showed CMA band size of 0.64 and 0.45, with chromosome length of 3.85 and 3.27, respectively. For *A. paramaca*, CMA⁺ bands were 0.48 and 0.22, with total chromosome length of 2.72 and 2.09, respectively. For *A. vulgare*, CMA⁺ bands were 0.72 and 0.61, with total chromosome length of 2.94 and 2.53, respectively.

Table 2. Comparison of haploid chromosome set and morphology of each pair for the four investigated species of *Astrocaryum*.

Pair	Species															
	<i>A. aculeatum</i>				<i>A. murumuru</i>				<i>A. paramaca</i>				<i>A. vulgare</i>			
	(L+S)	AR	CI	C	(L+S)	AR	CI	C	(L+S)	AR	CI	C	(L+S)	AR	CI	C
1	3.84	2.22	0.31	SM	3.88	2.08	0.325	SM	2.49	2.37	0.30	SM	3.21	2.28	0.31	SM
2	3.88	1.50	0.40	M	3.65	1.88	0.348	SM	2.18	2.12	0.32	SM	3.22	1.60	0.39	M
3	3.49	2.10	0.33	SM	3.52	1.21	0.453	M	2.15	1.48	0.40	M	2.96	1.79	0.36	SM
4	3.43	1.82	0.35	M	3.50	1.85	0.350	SM	2.06	1.55	0.39	M	2.86	2.38	0.30	SM
5	3.23	1.79	0.36	SM	3.39	1.89	0.346	SM	1.99	1.28	0.44	M	2.67	1.97	0.34	SM
6	3.12	1.56	0.39	M	3.35	1.17	0.461	M	1.84	1.33	0.43	M	2.55	1.29	0.44	M
7	3.00	1.30	0.44	M	3.23	2.58	0.279	SM	1.86	1.74	0.35	SM	2.52	1.71	0.37	SM
8	2.83	1.70	0.37	SM	3.22	1.23	0.449	M	1.77	1.25	0.44	M	2.42	1.66	0.38	M
9	2.80	1.42	0.41	M	3.01	1.28	0.439	M	1.73	1.68	0.37	SM	2.38	1.22	0.45	M
10	2.64	1.62	0.38	M	3.09	2.15	0.317	SM	1.74	1.34	0.43	M	2.24	1.33	0.43	M
11	2.58	1.28	0.44	M	3.05	1.48	0.403	M	1.59	1.51	0.40	M	2.16	1.46	0.41	M
12	2.39	1.59	0.39	M	2.91	1.20	0.455	M	1.54	1.38	0.42	M	2.07	1.11	0.47	M

Cont. **Table 2.** Comparison of haploid chromosome set and morphology of each pair for the four investigated species of *Astrocaryum*.

13	2.28	1.54	0.39	M	2.66	1.19	0.457	M	1.46	1.57	0.39	M	2.05	1.35	0.43	M
14	2.28	1.34	0.43	M	2.62	1.30	0.435	M	1.40	1.33	0.43	M	1.94	1.34	0.43	M
15	2.08	1.29	0.44	M	2.40	1.18	0.459	M	1.29	1.20	0.45	M	1.81	1.15	0.46	M

(L+S) is the total length of each chromosome pair, AR is the arm ratio (long arm/short arm), CI means centromeric index (short arm/total length) used to classify each pair according to the nomenclature proposed by Levan et al. (1964), C is the morphologic classification of each pair.

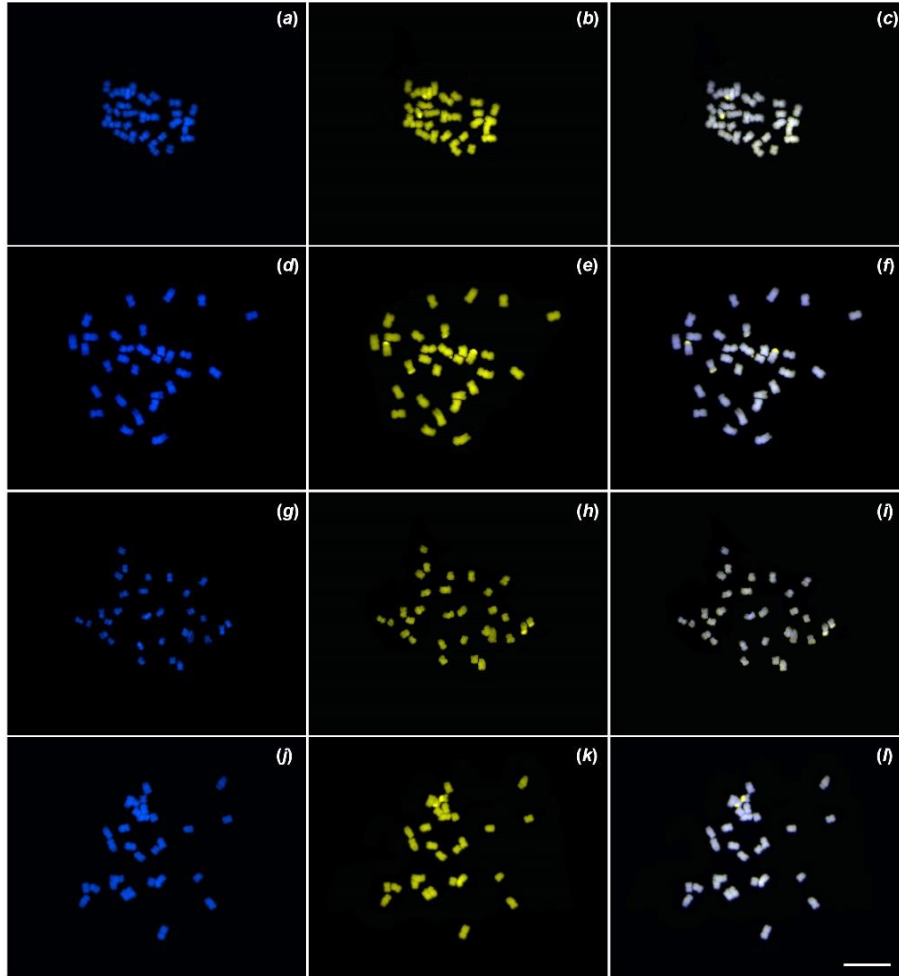


Figure 3. Fluorochrome banding with DAPI (blue) and chromomycin A3 (CMA) (yellow) in mitotic metaphases of *A. aculeatum* (a, b, c.); *A. murumuru* (d, e, f); *A. paramaca* (g, h, i) and *A. vulgare* (j, k, l). Bar = 10 μ m.

In all four species 45S rDNA site were co-located with CMA⁺ band (Figure 3 and 5). Species also showed only one pair of 5S rDNA site, however they differed in position, occurring in pericentromeric regions of the long arm of

chromosome pair 12 in *A. paramaca* and in short arm of chromosome pair 1 and 3 in *A. vulgare* and *A. aculeatum*, respectively, and it was interstitial for *A. murumuru*, in the long arm of chromosome pair 11. Hence, fluorochrome banding and *in situ* hybridization allowed to identify three chromosome pairs in *A. murumuru* and two chromosome pairs in *A. aculeatum*, *A. paramaca* and *A. vulgare*. *In situ* hybridization of telomere sequences were only observed in the terminal regions of chromosomes, suggesting absent of recent event of chromosome fusion (Figure 5).

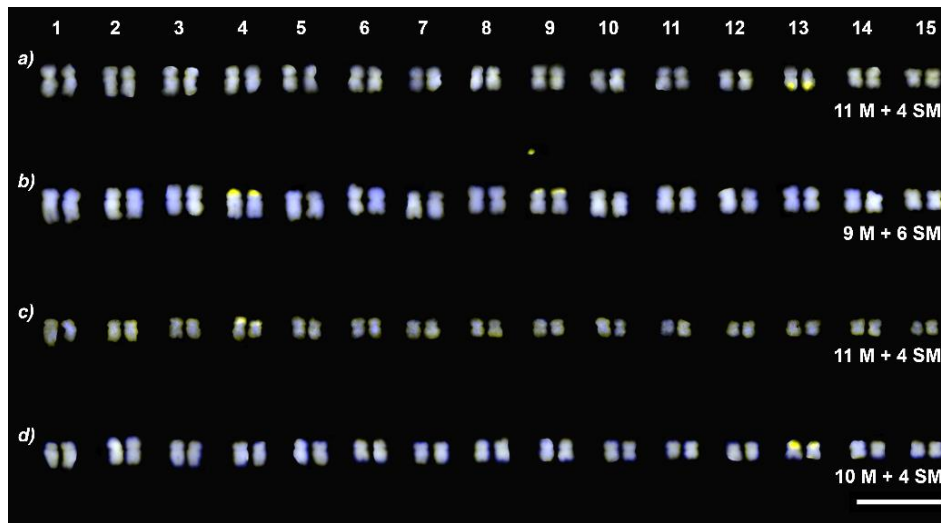


Figure 4. Karyograms of *A. aculeatum* (a), *A. murumuru* (b), *A. paramaca* (c) and *A. vulgare* (d) displaying fluorochrome banding pattern for chromomycin A3 (CMA) and DAPI. Bar = 10 μ m.

All results together allowed the karyological differentiation of each species belonging to different subgenera of *Astrocaryum* (Figure 6). Classified in the subgenus *Monogynanthus*, *A. murumuru* was characterized by the presence of two CMA⁺/DAPI bands that were coincident to 45S rDNA sites.

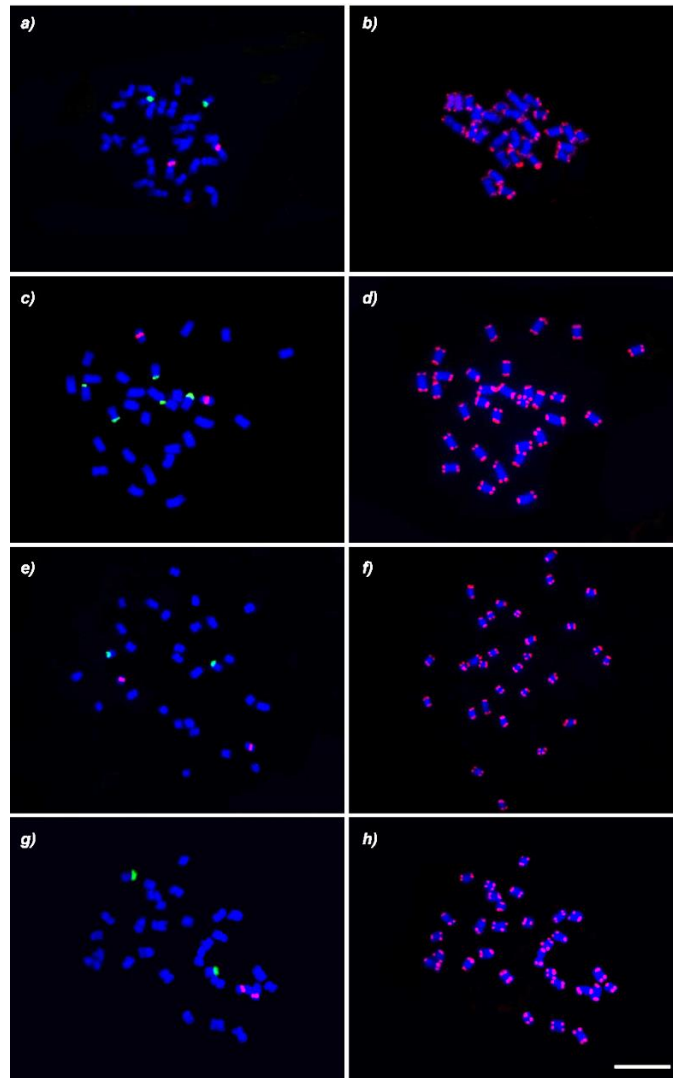


Figure 5. *In situ* hybridization of rDNA sites 45S (green) and 5S (red), and telomere sequence (b, d, f, and h) in mitotic metaphase counterstained with DAPI of *A. aculeatum* (a, b), *A. murumuru* (c, d), *A. paramaca* (e, f), and *A. vulgare* (g, h). Bar = 10 μ m.

In the subgenus *Astrocaryum*, *A. aculeatum* and *A. vulgare* exhibited the most similar karyotypes with one pair of CMA⁺/DAPI band also coincident with 45S rDNA site, and one chromosome pair with 5S rDNA, but CMA⁺/DAPI position on the chromosome can help distinguish them. Finally, *A. paramaca*, which belongs to the subgenus *Munbaca*, displayed the same number of CMA⁺/DAPI band of *A. aculeatum* and *A. vulgare*, but it can be identified by its highly different chromosome sizes, showing the lowest length for the haploid chromosome set.

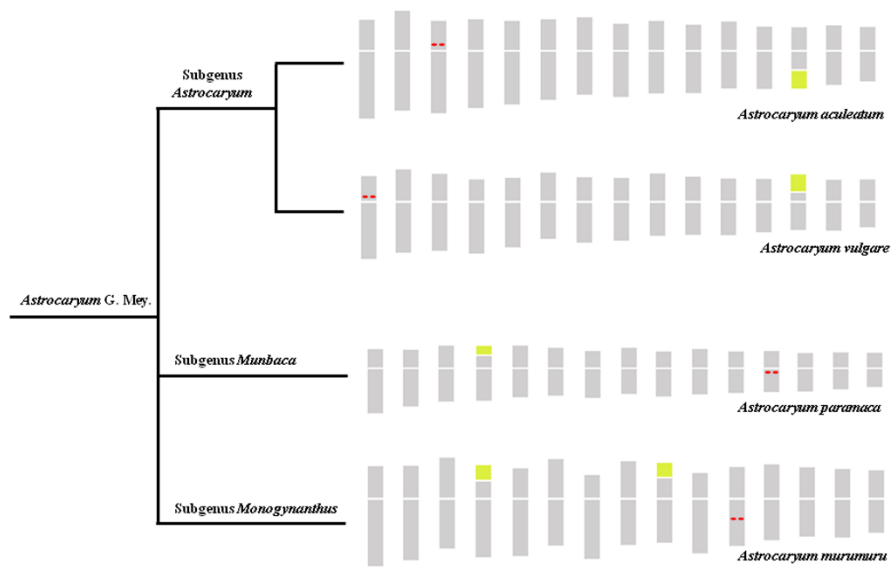


Figure 6. Comparison of idiograms obtained for the four species investigated of *Astrocaryum* genus in the three subgenera considered by Kahn (2008). Yellow parts on the chromosome arms refer to CMA⁺/DAPI bands and 45S rDNA sites and red dots represent 5S rDNA sites. Bar = 5 μ m.

DISCUSSION

This study presents the first relate of interphase nucleus, chromosome number and detailed karyotype analysis for four species of *Astrocaryum* belonging to the three different subgenera recognized by Kahn (2008). The chromosome number $2n = 30$ suggests the basic chromosome number $x = 15$. Same result was found for other species of Arecaceae in the Arecoideae subfamily, as for the macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) (Abreu et al., 2011), which also belongs to the subtribe Bactridinae, and by Röser (1994) and Röser et al. (1997) in *Bactris hondurensis* and *Desmocus polyacanthos*, both also included in Bactridinae. Although chromosome number among diploid palm species ranges from $2n = 26$ to 36 and all three types (reticulate, semi-reticulate and non-reticulate) of interphase nucleus are encountered (Röser, 1994, 1995; Röser et al., 1997), both karyological characteristics seem to be strongly constant among congener species, as we found for the four investigated species of *Astrocaryum*, and even in higher taxonomic groups, as demonstrated by Röser (1993) in a study with 13 genera of the same palm subfamily Coryphoideae, all showing $2n = 36$ chromosomes and similar chromatin organization in interphase among close related species. However, exceptions to this trend occur as demonstrated in a study conducted by Cepeda-Cornejo et al. (2012) where significant differentiation regarding the chromosome number was found for congener species of *Chamaedorea*, with *C. pinnatifrons* and *C. ernesti-augustis* exhibiting $2n = 26$, and *C. tepejilote* and *C. alternans* with $2n = 32$.

Results obtained with methods used to estimate chromosome asymmetry of the investigated species differed substantially. According to Stebbins (1958) all species were classified on the same category (2A), however Zarco's method enabled to separate species into three groups, in addition, distribution of species on the graphic resemble taxonomy classification following separation in three subgenera proposed by Kahn (2008) (Figure 6). The method proposed by Zarco is able to stress out slight differences among karyotypes of closed related species, as in the case of *Astrocaryum* species (Zarco, 1986).

Fluorochrome staining with CMA revealed band patterns similar to that found for several palm species by Röser (1994) where most taxa presented one or two chromosome pairs containing CMA⁺, and DAPI bands were commonly co-localized with them, both generally situated in terminal regions of the short arm, but it also occurred in the long arm of *Heterospathe woodfordiana* (2n = 32), *Johannesteijsmannia altifrons* (2n = 34) and *Phoenix pusilla* (2n = 32), as we found for *A. aculeatum*. The absence of DAPI⁺ bands is frequently reported in Arecaceae species (Röser, 1994), as observed in the species studied here, however, a recent study with *Trithrinax campestris* revealed an uncommon amount and pattern of heterochromatin, with CMA⁺ bands occurring in four chromosome pairs, three of them in paracentromeric region, and terminal/interstitial/paracentromeric DAPI⁺ bands occurring in all chromosome set (Gaiero et al., 2012). Results presented in this study for *Astrocaryum* species did not corroborate with Guerra (2000), in a review on the patterns of heterochromatin distribution in plants who observed a correlation between heterochromatin localization and chromosome size, with proximal bands occurring preferentially in small-sized chromosomes (< 3.0 µm). Although *A. aculeatum*, *A. paramaca* and *A. vulgare* displayed small chromosomes,

CMA⁺/DAPI⁻ bands are found in terminal regions of the chromosomes. Heteromorphism found for the chromosome pairs containing CMA⁺ and DAPI⁺ bands have already been reported for other Arecaceae species, e.g. *Calamus ornatus* (2n = 26), *Pseudophoenix vinifera* (2n = 34) (Röser, 1994), and *Licuala* sp. (2n = 28) (Röser 1994, 1995). In all cases, heteromorphism occurred when bands were located terminally on the chromosome. Roa and Guerra (2012) in a review on the distribution of 45S sites in chromosomes of plants also observed the occurrence of heteromorphism related to rDNA sites, for number and size, and this may be associated with their dynamic of inactivation and mobility on the genome. In the case of *Astrocaryum* species studied here, 45S sites were co-located with CMA⁺ bands.

Studies with *in situ* hybridization are still rare for Arecaceae, in general, but results found here for *Astrocaryum* species showed a similar pattern to that found for *Trithrinax campestris* where 45S rDNA sites corresponded to CMA⁺ bands and only one pair of 5S rDNA was observed, also located near the centromere (Gaiero et al., 2012), and for the oil palm (*Elaeis guineensis* L., 2n = 32) that exhibited only one chromosome pair with 45S rDNA site located in the terminal region and one pair with 5S rDNA located intercalary in the long arm (Castilho et al., 2000). Our results for *in situ* hybridization are coincident to the bias regarding the position and number of rDNA sites observed by Roa and Guerra (2012) for angiosperm species in which 45S rDNA sites seemed not to be randomly localized on the short arm in the terminal region of chromosomes, except for *A. aculeatum* in which it was located in the long arm, and the most common number of sites found was 2 and 4 per diploid karyotype. The only study that used telomere sequence in FISH did not find sites along the chromosome besides terminal regions as well as presented here, what suggests

that chromosome fusion is not a frequent event in chromosome evolution of *Astrocaryum* species. More studies with fluorescence *in situ* hybridization in palm species is still needed so trends can be established for Arecaceae as well as to help elucidating the processes involved on the evolution on palm chromosomes.

Röser (1995) has already proposed that decreasing dysploidy and chromosome rearrangements, such as unequal translocations, seem to be the most common events involved in the evolution of Arecaceae species leading to chromosome and genome size reductions. According to Stebbins (1958) these chromosome rearrangements tend to lead to more asymmetrical karyotypes. In this scenario one would expect to find karyotypes for *Astrocaryum* species less symmetrical than presented here. Our results support the hypothesis of decreasing dysploidy, once basal chromosome number in Arecoideae seems to be $2n = 36$ (Röser, 1994) and no telomere sequence was found along the chromosomes, but symmetry and haploid chromosome set length suggests that unequal translocations did not play an important role in the evolution of these species. The elimination of similar amount of genome in each chromosome pair seems more probable to have occurred, based on the symmetry showed by the karyotypes of the four investigated species. Although studies with palm species has increased in the last decade, much more information are needed to better understand palm evolution, especially for the subfamily Arecoideae which is the most diverse of Arecaceae (Dransfield et al., 2008).

Our results also suggest that chromosome staining and *in situ* hybridization may be an efficient tool for help on the cytotaxonomy of *Astrocaryum*. Nevertheless, more studies with other congener species need to be carry out.

CONCLUSIONS

Organization of chromatin in interphase nuclei and chromosome number are constant for the four *Astrocaryum* species investigated precluding the utilization of both characteristics for species recognition.

Fluorochrome staining and *in situ* hybridization together allow for species characterization of different subgenus of *Astrocaryum*, with *A. aculeatum* and *A. vulgare* (subgenus *Astrocaryum*) presenting one pair of CMA/DAPI band and one site of 45S and 5S rDNAs; *A. paramaca* (subgenus *Munbaca*) with same fluorochrome pattern but chromosome length much inferior; and *A. murumuru* (subgenus *Monogynanthus*) exhibiting two pairs of CMA/DAPI band and 45S rDNA, and one pair of 5S.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Brazilian Agencies Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) and Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for granting the scholarship to the first author; Embrapa Amazônia Oriental for funding the project; Joel Pinheiro da Silva for plant material sampling; Embrapa Amapá for providing plant material of *Astrocaryum murumuru*.

REFERENCES

Abreu IS, Carvalho CR, Carvalho GMA, Motoike SY (2011) First karyotype, DNA C-value and AT/CG base composition of macaw palm (*Acrocomia*

aculeate, Arecaceae) – a promising plant for biodiesel production. *Australian Journal of Botany* **59**(2), 149-155.

Altinordu F, Peruzzi L, Yu Y, He X (2016) A tool for the analysis of chromosomes: KaryoType. *Taxon*, 7p.

Battistin A, Almeida ALSM, Gonçalves RS, Fermino MH, Silveira JRP, Busnello AC, Pasquetti MV (2012) Germinação das sementes e análise citogenética em duas espécies de palmeiras. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* **18**, 79-84.

Castilho A, Vershinin A, Heslop-Harrison JS (2000) Repetitive DNA and chromosomes in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*). *Annals of Botany* **85**, 837-844.

Cepeda-cornejo V, Palomino G, Méndez I, Dirzo R (2012) Intersexual comparison of DNA content by flow cytometry, and chromosome number in four dioecious *Chamaedorea* palms from México. *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics* **65**(4), 263-270.

Clement CR, Lleras Perez E, Van Leeuwen, J (2005) O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. *Agrociências* **9**(1-2), 67-71.

Corrêa LB, Barbieri RL, Rossato M, Büttow MV, Heiden G (2009) Caracterização cariológica de palmeiras do gênero *Butia* (Arecaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura* **31**(4), 1111-1116.

Dong F, Song J, Naess SK, Helgeson JP, Gebhardt C, Jiang J (2000) Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theoretical Applied Genetics* **101**, 1001–1007.

Dransfield J, Uhl NW, Asmussen CB, Baker WJ, Harley MM, Lewis CE (2008) ‘Genera palmarum: the evolution and classification of palms.’ 2nd edn. (Kew Publishing: London).

Ferreira SAN, Gentil DFO (2006) Extração, embebição e germinação de sementes de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*). *Acta Amazônica* **36**(2), 141-146.

Gaiero P, Mazzella C, Vaio M, Barros e Silva AE, Santiñaque FF, López-Carro B, Follé GA, Guerra M (2012) An unusually high heterochromatin content and

large genome size in the palm tree *Trithrinax campestris* (Arecaceae). *Australian Journal of Botany* **60**(4), 378-382.

Guerra MS (1987) Cytogenetics of rutaceae: IV., structure and systematic significance of interphase nuclei. *Cytologia*, Tokyo, **52**, 213-222.

Guerra MS (2000) Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology*, **23**(4), 1029-1041.

Guerra MS, Souza MJ (2002) 'Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana.' (Funpec: Riberão Preto).

Kahn F (2008) The genus *Astrocaryum*. *Rev. Peru. Biol.*, **15**, 31-48.

Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* **52**, 201-220.

Roa F, Guerra M (2012) Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. *BioMed Central Evolutionary Biology* **12**, 225.

Röser M (1999) Chromosome structures and karyotype rearrangement in Palms (Palmae). *Memoirs of the New York Botanical Garden* **83**, 61-71.

Röser M (2000) DNA amounts and qualitative properties of nuclear genomes in palms (Arecaceae). In 'Monocots. Systematics and evolution'. (Eds KL Wilson, DA Morrison) pp. 538-544. (CSIRO Publishing: Melbourne)

Röser M (1994) Pathways of karyological differentiation in palms (Arecaceae). *Plant Systematics and Evolution* **189**, 83-122.

Röser M (1995) Trends in the karyo-evolution of palms. In 'Kew Chromosome Conference IV' (Eds PE Brandham, MD Bennett) pp. 249-265. (Kew: Royal Botanic Gardens).

Röser M (1993) Variation and evolution of karyotype characters in palm subfamily Coryphoideae Sl. *Botanica Acta* **106**, 170-182.

Röser M, Johnson M, Hanson L (1997) Nuclear DNA amounts in palms (Arecaceae). *Botanica Acta* **110**, 79-89.

Siljak-Yakovlev S, Benmalek S, Cerbah M, Coba de la Peña T, Bounaga N, Brown SC, Sarr A (1996) Chromosomal sex determination and heterochromatin structure in date palm. *Sex Plant Reproduction* **9**, 127-132.

Stace CA (2000) Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. *Taxon*, **49**, 451–477.

Stebbins GL (1958) Longevity, habitat, and release of genetic variability in the higher plants. In 'Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology'. V. 23, pp. 365-378 (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Yu Y., Altınordu F., Peruzzi L., He X.J. 2015. KaryoType 2.0. Available at <http://mnh.scu.edu.cn/soft/blog/KaryoType>

Zarco RC (1986) A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon*, **35**(3), 526-530.