

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
TROPICAL E RECURSOS NATURAIS - PPGBTRN

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DO
BANCO DE GERMOPLASMA DE CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*
(H.B.K.) McVAUGH) UTILIZANDO MARCADORES
MICROSSATÉLITES

DANIELA KOSHIKENE

Tese apresentada ao Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração em Botânica.

MANAUS - AM
2009

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
TROPICAL E RECURSOS NATURAIS - PPGBTRN

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DO
BANCO DE GERMOPLASMA DE CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*
(H.B.K.) McVAUGH) UTILIZANDO MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

DANIELA KOSHIKENE

ORIENTADOR: DR. KAORU YUYAMA
CO-ORIENTADORA: DORIANE PICANÇO RODRIGUES

Tese apresentada ao Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração em Botânica.

MANAUS - AM
2009

K86

Koshikene, Daniela

Análise da variabilidade genética de populações do Banco de Germoplasma de Camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) utilizando marcadores microssatélites / Daniela Koshikene.--- Manaus : [s.n.], 2010.
97 f. : il.

Tese (doutorado)-- INPA, Manaus, 2010

Orientador : Kaoru Yuyama

Co-orientador : Doriane Picanço Rodrigues

Área de concentração : Ciências Biológicas, Agrárias e Humanas

1. *Myrciaria dubia*. 2. Microssatélites. 3. Diversidade genética. 4. Banco de Germoplasma. I. Título.

CDD 19. ed. 583.420415

Sinopse:

Foram desenvolvidos marcadores moleculares microssatélites de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) para caracterização dos exemplares existentes do Banco Ativo de Germoplasma de camu-camu do INPA. Sete marcadores foram utilizados para avaliar a estrutura e a diversidade genética de 17 populações presentes no BAG.

Palavras-chave: *Myrciaria dubia*, microssatélites, diversidade genética, Banco de Germoplasma.

Ao meu pai Manoel Y. Koshikene
À minha mãe Celina K. Koshikene
À minha tia Lucia Kisanuki

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Kaoru Yuyama pela orientação, pela amizade e por ter me apoiado e possibilitado a realização deste trabalho.

À Dra. Doriane Picanço Rodrigues pela orientação, compreensão e suporte em todo o trabalho.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA e Universidade Federal do Amazonas - UFAM, incluindo os pesquisadores, os professores e os funcionários, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Secretaria da Coordenação em Pesquisas em Botânica do INPA, em particular à Neide pelo apoio e amizade.

Aos funcionários da Secretaria da Coordenação em Pesquisas em Agronomia do INPA.

Aos colegas e amigos do Curso de Botânica do INPA, principalmente à Chistinny Giselly Bacelar Lima pela amizade nos mais variados momentos.

Aos amigos Karime Rita Bentes da Silva e Roberto Moreira da Silva Junior pelo incentivo e contribuição direta no desenvolvimento do trabalho.

Aos funcionários do Banco de Germoplasma de Camu-camu no INPA – Estação Experimental de Olericultura e Estação Experimental de Fruticultura Tropical, pela ajuda na coleta de material.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Evolução Aplicada e do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetal da Universidade Federal do Amazonas pelo convívio e amizade.

Aos amigos Delson Tavares de Freitas Junior, Luana Karen Holanda da Cunha e Marcelo dos Santos Neves pelo apoio e compreensão oferecidos durante todo o período.

A todos os colegas do INPA e da UFAM pelo apoio.

À minha família pelo incentivo, amor e torcida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e ao Programa Bolsas de Estudo para a Conservação da Amazônia - BECA do Instituto Internacional de Educação do Brasil - IEL pelo apoio financeiro e valorização da pesquisa.

Às demais pessoas que, de alguma forma, contribuíram neste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO..... | 15 |
| ABSTRACT | 16 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 19 |
| 2.1. Descrição e distribuição geográfica da espécie..... | 19 |
| 2.2. Utilização e importância do camu-camu | 21 |
| 2.3. Germoplasma vegetal de camu-camu..... | 23 |
| 2.4. Marcadores moleculares..... | 26 |
| 2.4.1. Microssatélites..... | 27 |
| 2.5. Diversidade genética em plantas | 32 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 36 |
| 3. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROSSATÉLITES EM CAMU-CAMU (<i>MYRCIARIA DUBIA</i> (H.B.K.) MCVAUGH) | 48 |
| RESUMO..... | 49 |
| ABSTRACT | 50 |
| 3.1. INTRODUÇÃO | 51 |
| 3.2. MATERIAL E MÉTODOS | 53 |
| 3.2.1. Desenvolvimento dos microssatélites a partir de Biblioteca Enriquecida..... | 53 |
| 3.2.1.1. Construção da Biblioteca Enriquecida..... | 53 |
| 3.2.1.2. Seleção, seqüenciamento de clones positivos e desenho de <i>primers</i> | 55 |
| 3.2.2. Caracterização dos <i>loci</i> microssatélites (SSR)..... | 56 |
| 3.2.2.1. Testes de polimorfismo | 56 |
| 3.2.2.2. Caracterização genética dos <i>loci</i> microssatélites desenvolvidos..... | 57 |

| | |
|---|----|
| 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 58 |
| 3.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 62 |
| 4. ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE CAMU-CAMU (<i>Myrciaria dubia</i> (H.B.K.) MCVAUGH) DO BANCO DE GERMOPLASMA DO INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES..... | 65 |
| RESUMO..... | 66 |
| ABSTRACT..... | 67 |
| 4.1. INTRODUÇÃO | 68 |
| 4.2. MATERIAL E MÉTODOS | 71 |
| 4.2.1. Coleta de material genético e extração de DNA | 71 |
| 4.2.2. Amplificação dos <i>loci</i> microssatélites | 72 |
| 4.2.3. Análise genética..... | 73 |
| 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 76 |
| 4.3.1. Diversidade alélica dos <i>loci</i> microssatélites em camu-camu..... | 76 |
| 4.3.2. Diversidade genética inter e intrapopulacional | 80 |
| 4.3.3. Distâncias genéticas | 84 |
| 4.4. CONCLUSÃO | 88 |
| 4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 90 |

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1. (A) planta e (B) fruto de camu-camu.....20

CAPÍTULO 4

Figura 1. Localização dos pontos de coleta de acessos de camu-camu71

Figura 2. Número de alelos privados para as 17 populações analisadas de *Myrciaria dubia*.....78

Figura 3. Padrão de divergência genética entre as 17 populações de *Myrciaria dubia* do BAG, baseado no agrupamento UPGMA utilizando as distâncias genéticas de Rogers (1972) modificadas (Wright, 1978). Dados provenientes de sete *loci* microssatélites.....85

Figura 4. Representação da correlação entre a matriz de distâncias geográficas e a matriz de distâncias genéticas86

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Comparação dos teores de ácido ascórbico do camu-camu analisados por diversos autores com acerola, caju e laranja pêra.....22

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Freqüência dos motivos de repetição de microssatélite encontrados em *Myrciaria dubia*58

Tabela 2. Porcentagem dos microssatélites encontrados em *Myrciaria dubia* de acordo com o tipo de repetição58

Tabela 3. Características de nove *loci* microssatélites de *Myrciaria dubia* (população do Rio Uatumã, Amazonas, Brasil, $n = 41$): T_a temperatura de anelamento do *primer*; A número de alelos por *locus*; D_L poder discriminatório estimado; D poder discriminatório calculado; H_o heterozigosidade observada; H_e heterozigosidade esperada60

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Índices de diversidade genética a partir de sete *loci* microssatélites em 214 acessos de *Myrciaria dubia*77

Tabela 2. Classificação dos alelos encontrados em acessos de 17 localidades do BAG camu-camu (*Myrciaria dubia*), de acordo com sua freqüência e distribuição em sete *loci* microssatélites.....77

Tabela 3. Estimativas das estatísticas F de Wright, de Rst e do número de migrantes por geração (Nm) em 17 populações de *Myrciaria dubia* do BAG. Intervalo de confiança (IC) de 95% de probabilidade.....80

Tabela 4. Estimativas dos parâmetros genéticos baseados em sete *loci* de microssatélites para 17 populações de *Myrciaria dubia* do BAG: número de acessos analisados por população (N), número total de alelos (A_t), número médio de alelos por acesso (A_i), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o) e índice de fixação (f)82

Tabela 5. Fluxo gênico [M (número absoluto de migrantes) = $2Nm$ – diagonal abaixo] e matriz de divergência (F_{ST} – diagonal acima) entre 17 populações de *Myrciaria dubia* do BAG, a partir de sete *loci* microssatélites83

Tabela 6. Distâncias genéticas de Rogers (1972) modificadas (Wright, 1978) entre 17 populações de *Myrciaria dubia* do BAG, a partir de sete *loci* microssatélites.....84

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|-------------------------|---|
| A | base nitrogenada adenina |
| BAG | Banco Ativo de Germoplasma |
| C | base nitrogenada citosina |
| DNA | ácido desoxirribonucléico |
| dNTP | dinucleotídeotrifosfato |
| EST | <i>Expressed Sequence Tag</i> |
| EST-SSR | <i>Expressed Sequence Tag - Simple Sequence Repeats</i> |
| EXO | exonuclease |
| FAM | fluorocromo carboxi-fluoresceína |
| G | base nitrogenada guanina |
| g | grama |
| h | hora |
| HCl | ácido clorídrico |
| INPA | Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas |
| kb | kilobase, 1000 pares de bases |
| KCl | cloreto de potássio |
| LB | meio de cultura Luria-Bertani |
| mg | miligrama |
| MgCl₂ | cloreto de magnésio |
| min | minuto |
| MIV | maturação <i>in vitro</i> |
| ml | mililitro |
| mM | milimolar |

| | |
|----------------------|------------------------------------|
| ng | nanograma |
| pb | pares de bases |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| pH | potencial hidrogeniônico |
| pmol | picomol |
| s | segundo |
| SAP | <i>Shrimp Phosphatase Alcaline</i> |
| SSR | <i>Simple Sequence Repeats</i> |
| T | base nitrogenada timina |
| T_a | temperatura de anelamento |
| U | unidade |
| UFAM | Universidade Federal do Amazonas |
| °C | graus Celsius |
| μg | micrograma |
| μL | microlitro |
| μM | micromolar |

ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Freqüências alélicas dos sete <i>loci</i> microssatélites estimados a partir de 214 acessos de 17 populações de <i>Myrciaria dubia</i> | 93 |
| Anexo 2. Alelos privados e freqüência com que ocorrem em cada população..... | 96 |
| Anexo 3. Agrupamentos das populações determinadas pelo programa Structure..... | 97 |

RESUMO

O camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) é um arbusto endêmico da Amazônia que se desenvolve em áreas periodicamente alagadas. Seus frutos possuem o maior conteúdo de ácido ascórbico conhecido, sendo por isso utilizado na fabricação de diversos produtos. O Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia mantém um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de camu-camu com plantas desenvolvidas a partir de sementes coletadas em diversas localidades. A utilização de marcadores moleculares microsatélites permite a caracterização dos exemplares existentes no BAG, demonstrando a estruturação e a variabilidade genética existentes, o que possibilita a orientação na seleção de matrizes e na manutenção da diversidade genética. Para tanto, foram desenvolvidos 12 *primers* microsatélites a partir de uma biblioteca genômica enriquecida, sendo nove polimórficos. O número de alelos por *locus* variou de 3 a 10, com uma média de 6,89 alelos por *locus*. A heterozigosidade observada (H_O) apresentou uma média de 0,531, enquanto a heterozigosidade esperada (H_E), 0,679. Os valores de poder de discriminação estimado D_L foram maiores que 0,75 em seis *loci*, estando próximo a este valor em um *locus*. Os valores de D foram superiores em sete *loci*, sendo estes considerados mais informativos e utilizados para as análises das populações. Para auxiliar programas de melhoramento, foram avaliadas a diversidade, a estrutura e as relações genéticas de 17 populações do Banco de Germoplasma do INPA. Sete *loci* microsatélites continham um total de 135 alelos, com média de 19,3 alelos por *locus*. Os resultados dos parâmetros de diversidade genética sugerem a existência de um excesso de homozigotos. A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que 79,39% do total da variação genética foi encontrada dentro dos acessos e 20,61% entre as populações, demonstrando a existência de estruturação genética. Não houve correlação entre distâncias genéticas e geográficas ($r = 0,23$), indicando que as populações não se encontram estruturadas no espaço. Essas informações poderão oferecer apoio na organização do BAG e na orientação de cruzamentos, definindo os acessos/populações mais divergentes geneticamente.

Palavras chave: *Myrciaria dubia*, marcadores moleculares, microsatélites, diversidade genética, banco de germoplasma

ABSTRACT

The camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh) is an Amazonian endemic shrub that develops in periodically flooded areas. Its fruits have the highest content of ascorbic acid known and is therefore used in the manufacture of various products. The Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia maintains an active germplasm collection (BAG) of camu-camu with plants grown from seeds collected in several localities. The use of microsatellite molecular markers allows the characterization of accessions in the BAG, showing the existing structure and genetic variability, which provides guidance in the selection of matrices and the maintenance of genetic diversity. Thus, were developed 12 microsatellite primers from a genomic enriched library, nine polymorphic. The number of alleles per *locus* ranged from 3 to 10, with a mean of 6.89 alleles per *locus*. The observed heterozygosity (H_o) had an average of 0.531 and the expected heterozygosity (H_e) had an average of 0.679. The discrimination power values D_L were higher than 0.75 in six loci, close to this value at a *locus*. The D values were higher in seven *loci*, which are considered more informative and used for analysis of populations. To help programs for improvement, were evaluated diversity, structure and genetic relationships of 17 populations of the INPA active germplasm collection. Seven microsatellite *loci* contained a total of 135 alleles, with an average of 19.3 alleles per *locus*. The results of the parameters of genetic diversity suggest the existence of an excess of homozygotes. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed that 79.39% of the total genetic variation was found within the accessions and 20.61% among populations, demonstrating the existence of genetic structuring. There was no correlation between genetic and geographical distances ($r = 0.23$) indicating that populations are not structured in space. Such information can support the organization of the BAG and the direction of crosses, defining the access/ populations genetically divergent.

Keywords: *Myrciaria dubia*, molecular markers, microsatellites, genetic diversity, active germplasm collection

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Myrciaria dubia*, uma mirtácea conhecida popularmente como camu-camu, é um arbusto endêmico da Região Amazônica, que ocorre naturalmente nas margens de cursos de água e nas áreas periodicamente inundadas. Seu fruto possui o maior conteúdo de vitamina C conhecido atualmente, razão pela qual é aproveitado para elaboração de diversos produtos, desde cosméticos a alimentícios. Apesar de pouco consumido no Brasil, tanto *in natura* como industrializado, o camu-camu é bastante conhecido em outros países, principalmente no Japão e nos Estados Unidos, os quais são mercados consumidores já consolidados. O abastecimento deste mercado consumidor é feito basicamente pela forma extrativista, o que provoca desequilíbrio para a espécie no ambiente natural e resulta no fornecimento do fruto como uma matéria prima com características não padronizadas.

O camu-camu possui uma alta variabilidade fenotípica (Yuyama *et al.*, 2002; 2003) que ocorre tanto em ambientes naturais como em plantios em terra firme onde as condições ambientais são similares para todas as plantas. O INPA mantém um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Camu-camu com acessos provenientes dos Estados do Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima, e de Iquitos no Peru (Yuyama *et al.*, 2002). Essas plantas foram parcialmente caracterizadas quanto à morfo-fenologia, pragas e doenças (Barbosa *et al.*, 2004), produtividade, teor de ácido ascórbico, pH e sólido solúvel (Yuyama *et al.*, 2003), e geneticamente usando microssatélites gênicos (Rojas Gonzalez, 2007).

Os microssatélites genômicos são considerados mais polimórficos que os gênicos por não estarem associados às regiões transcritas do genoma (Varshney *et al.*, 2005). Além disso, são marcadores moleculares extremamente informativos para análises de fluxo gênico, diversidade e estrutura genética (Conte *et al.*, 2004; Nybom *et al.*, 2004; Karasawa *et al.*, 2005; Ottewell *et al.*, 2005; Steane *et al.*, 2006; Ferreira-Ramos *et al.*, 2008; Payn *et al.*, 2008).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a variabilidade genética de acessos de diferentes populações no Banco Ativo de Germoplasma de Camu-camu do INPA, utilizando marcadores moleculares microssatélites. No capítulo 3 é mostrado o isolamento e caracterização dos microssatélites. No capítulo 4 foram avaliados os níveis e a forma como a variabilidade genética é mantida dentro do BAG, por meio dos índices de diversidade genética e distâncias genéticas.

Este trabalho gerou informações que podem ser utilizadas em um programa de melhoramento para esta espécie, fornecendo base para a escolha de plantas geneticamente selecionadas para cruzamentos tanto a partir de acessos como de populações, assim como para a tomada de decisões acerca da eliminação e/ou inclusão de materiais de novas coletas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Descrição e distribuição geográfica da espécie

O camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh), também conhecido caçari, araçá-d'água (Ferreira, 1986), araçá-de-igapó (Mera, 1987), guayabo e guayabito (Castañeda, 1961), é um representante nativo na Amazônia da família Myrtaceae (McVaugh, 1958; 1963). Apresenta, como sinônimas, *Psidium dubium* H.B.K., *Myrciaria paraensis* (McVaugh, 1963), *Eugenia divaricata* Benth., *M. phillyraeoides* Berg., *M. divaricata* (Benth.) Berg. (McVaugh, 1969), *M. spruceana* Berg. (Gutierrez, 1969) e *M. riedeliana* Berg. (Mera, 1987).

A planta possui hábito arbustivo, podendo alcançar até 8 m de altura (McVaugh, 1958). Possui copa ramificada, frondosa, com ramos delgados, flexíveis, pendentes (Gutierrez, 1969), cilíndricos, lisos e de coloração marrom-clara ou avermelhada (Figura 1A). As raízes são profundas e possuem muitos pêlos absorventes (Picón *et al.*, 1987). As folhas são simples, opostas, glabras, glandulosas, penínervas, membranáceas e pecioladas; o limbo é ovado, elíptico ou lanceolado; o ápice é agudo ou gradualmente acuminado; a base é arredondada ou subcuneada; a margem é inteira e ligeiramente ondulada (McVaugh, 1958; Castañeda, 1961). A inflorescência apresenta até quatro flores hermafroditas dispostas em dois pares; as quatro sépalas são arredondadas e de coloração verde; as quatro pétalas são ovadas e de coloração branca. O fruto, baga globosa, mede entre 1-3 cm de diâmetro e pesa entre 6-9 g; o epicarpo delgado é liso, lustroso, granduloso e possui

2.1. Descrição e distribuição geográfica da espécie

coloração púrpura ou avermelhada; a polpa sucosa é ácida, aromática e de coloração branca (Figura 1B). Contém de uma a quatro sementes reniformes por fruto, com o peso unitário variando entre 0,6 e 0,9 g, sendo este peso inversamente proporcional ao número de sementes por fruto (McVaugh, 1958; Gutierrez, 1969; Calzada Benza & Rodrigues, 1980; Picón *et al.*, 1987).



Figura 1. (A) planta e (B) fruto de camu-camu.

O camu-camu é encontrado naturalmente nas margens dos rios, lagos e igapós, tanto nas águas escuras (Calzada Benza, 1980; Mera, 1987) como nas águas brancas (Falcão *et al.*, 1993). Essa espécie tem adaptação ao clima tropical úmido, sendo tolerante às inundações, podendo ficar submersa durante quatro a cinco meses ao ano (Peters & Vásquez, 1988) e tolerar seca por três meses (Villachica, 1996). Sua distribuição aparente vai da região central do estado do Pará, passando pelo médio e alto rio Amazonas, até a parte oriental do Peru, ao longo do rio Casiquiare e grande porção da alta e média bacia do rio Orinoco (McVaugh, 1969). Nos estados do Amazonas, Rondônia e Roraima, o camu-camu é encontrado naturalmente (Chávez Flores, 1988), e ao longo dos rios e lagos da Amazônia peruana são encontradas grandes populações

2.1. Descrição e distribuição geográfica da espécie

nativas quase que monoespecíficas (Peters & Vasquez, 1987). Keel & Prance (1979) também verificaram a densa ocorrência de camu-camu no Rio Negro, de águas pretas, sendo uma área de floresta sob severo estresse ambiental com solo pobre e inundação sazonal, em uma região próxima à cidade de Manaus, mostrando a dominância desta espécie no local, com um valor de importância máxima de 75,78 (MIV), demonstrando, desta forma, que na Bacia Amazônica também ocorre uma grande população monoespecífica.

2.2. Utilização e importância do camu-camu

Seus frutos fazem parte da alimentação de espécies da ictiofauna, como o tambaqui (*Colossoma macropomum*), o pacu (*Mylossoma spp.*), o matrinhã (*Brycon cephalus*) e o curimatã (*Prochilodus nigricans*) (Mera, 1987; Peters & Vasquez, 1987). Além disso, é utilizado pela população humana na elaboração de sucos e refrescos, sorvetes, doces, vinhos, coquetéis, vinagres, licores e geléias (Picón *et al.*, 1987; Riva Ruiz, 1994; Yuyama *et al.*, 2002a; Maeda & Andrade, 2003).

Tradicionalmente, o camu-camu é usado de diversas formas pela população amazônica: da casca do caule e da raiz é feita uma infusão para o tratamento de diarreia e reumatismo; raspas da casca são aplicadas diretamente para aliviar dores musculares; folhas trituradas são usadas para febre e dor de cabeça (Pinedo, 2004). No entanto, é pelo seu conteúdo extremamente alto de ácido ascórbico que o camu-camu tem despertado o interesse de diversos países. Apresenta uma variação de vitamina C de 0,845 a 6,1 g em 100 g de polpa integral (Yuyama *et al.*, 2002a), quantidade esta

2.2. Utilização e importância do camu-camu

superior à de diversos frutos, superando inclusive a acerola, cuja concentração varia de 0,973 a 2,786 g em 100g de polpa (Matsuura *et al.*, 1998), até então considerada como a fruta mais rica em conteúdo de ácido ascórbico no Brasil (Tabela 1). O sorvete produzido a partir de polpa de camu-camu contém cerca de 560 mg de vitamina C, e a geléia apresenta concentrações superiores a 710 mg desta substância por 100 g de produto, demonstrando que a vitamina C nesta espécie apresenta ainda grande estabilidade, mesmo quando submetida a diferentes tipos de processamentos e temperaturas (Yuyama *et al.*, 2002a).

Tabela 1. Comparação dos teores de ácido ascórbico do camu-camu analisados por diversos autores com acerola, caju e laranja pêra.

| Fruto | Teor de ácido ascórbico (mg/100 g de polpa) | Autores |
|--------------|---|-------------------------------|
| Camu-camu | 2880 | Roca, 1965 |
| Camu-camu | 845 - 939 | Zapata & Dufour, 1993 |
| Camu-camu | 2489 - 3133 | Andrade <i>et al.</i> , 1995 |
| Camu-camu | 1910 - 2061 | Alves <i>et al.</i> , 2000 |
| Camu-camu | 3571 - 6112 | Yuyama <i>et al.</i> , 2002 |
| Camu-camu | 2585 | Maeda <i>et al.</i> , 2006 |
| Acerola | 973 - 2786 | Matsuura <i>et al.</i> , 1998 |
| Caju | 138,7 | TACO, 2006 |
| Laranja pêra | 53,7 | TACO, 2006 |

Quanto aos demais componentes, a casca apresenta antocianina, importante antioxidante e corante natural (Andrade, 1993). O fruto é uma fonte potencial de fibra alimentar total, insolúvel e solúvel, numa concentração média de 2,88 g, possuindo também um alto conteúdo de flavonóides e pectinas (Yuyama *et al.*, 2002b), sendo portanto uma opção na alimentação regional. Considerando 100 g de polpa, os teores de proteínas variam entre 400 mg a 890 mg, de carboidratos, entre 3500 mg a 4700 mg (Roca, 1965; Andrade,

2.2. Utilização e importância do camu-camu

1993; Justi *et al.*, 2000), de sódio, entre 27 mg a 111,3 mg, de potássio, entre 532 mg a 838,8 mg, de cálcio, entre 62 mg a 157,3 mg e de ferro, entre 1,3 mg a 1,8 mg (Zapata & Dufour, 1993; Justi *et al.*, 2000). Rodrigues *et al.* (2006) demonstraram que os frutos de camu-camu, devido ao conteúdo de antocianinas e flavonóides, possuem uma destacada capacidade antioxidante; em estudos comparativos com outras frutas que também possuem antioxidantes, como o açaí (*Euterpe oleraceae*), o mirtilo (*Vaccinium myrtillus*), a maçã (*Malus domestica*) e a laranja (*Citrus sinensis* L.), o camu-camu apresentou os valores mais elevados dentre todos os alimentos estudados até este momento.

2.3. Germoplasma vegetal de camu-camu

Os recursos genéticos vegetais compreendem plantas cultivadas e espécies silvestres com valor potencial ou comprovado, como é o caso do camu-camu. A manutenção desses recursos pode ocorrer por meio do estabelecimento de áreas de proteção ambientais e pela coleta e manutenção desses materiais, os quais passam a ser denominados germoplasma.

O Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) mantém um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de camu-camu com acessos provenientes de diferentes rios da Bacia Amazônica, parcialmente caracterizados quanto ao conteúdo de vitamina C, produção e arquitetura (Yuyama *et al.*, 2003; Barbosa *et al.*, 2004). As plantas deste BAG estão distribuídas entre a Estação Experimental de Olericultura, situada no km 14 da Rodovia AM-010, e a

2.3. Germoplasma vegetal de camu-camu

Estação Experimental de Fruticultura Tropical, localizada no km 42 da Rodovia BR-174, ambos em Manaus-AM.

As plantas provenientes da região de Iquitos são oriundas das sementes trazidas por Wanders B. Chavez Flores em 1978. Os acessos provenientes dos rios Cauamé (RR), Jamari (RO), Jarú (RO), Urupá (RO), Machado (RO), Candeias (RO), Madeira (RO), Javari (fronteira entre Amazonas e Peru) e Uatumã (AM) foram coletados a partir do projeto PTU/CNPq – Projeto Domesticação de germoplasma silvestre de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) para uso na agroindústria na Amazônia Brasileira (1998 – 2000). Os acessos das ilhas Pirarara (AM) e Pirarucu (AM) e dos rios Aracá (AM), Urubu (RR), Tarumã (AM), Trombetas (PA) e Tocantins (PA, cidade de Marabá) foram coletados durante o projeto PPG7 (CCE)/FINEP - Projeto Domesticação de germoplasma silvestre de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) para uso de agroindústria da Amazônia (2000 – 2003) (Yuyama, 2002b).

Vásquez (2000) relata diferentes tipos de plantas caracterizadas pelas condições fenotípicas de germinação, crescimento, tronco, época de coleta, casca e cor da fruta, textura, teores de vitamina C, destacando-se a forma das plantas e o conteúdo de vitamina C. As características de produção, ramificação, produção por árvore e conteúdo de vitamina C são características muito variáveis entre os acessos, e são indicadores da ampla variabilidade fenotípica da espécie. Sidney *et al.* (2000) encontraram diferenças significativas para comprimento, diâmetro e peso do fruto, altamente significativas para peso da polpa, indicando que existe suficiente variabilidade para esses caracteres, capazes de discriminarem as populações estudadas. Por outro lado, nas

2.3. Germoplasma vegetal de camu-camu

variáveis peso e número de sementes, produtividade e rendimento em polpa, não foram detectadas diferenças estatísticas significativas, indicando pouca variabilidade para estas características nas condições estudadas.

Teixeira *et al.* (2004) avaliaram três população de camu-camu (Iquitos no Peru, Cauamé em Roraima e Uatumã no Amazonas), utilizando marcadores isoenzimas de esterase e esterase-D, demonstrando que ocorrem diferenças genéticas entre as três populações estudadas e um maior polimorfismo dentro da população de Uatumã.

Rojas Gonzalez (2007) analisou 17 populações de camu-camu utilizando oito *loci* microssatélite gênicos, encontrando baixos valores de heterozigosidade observada H_o em todas as populações. O dendograma mostrando as distâncias genéticas agrupadas encontrou dois grupos principais (Grupo 1 formado pelas populações de Rondônia, Amazônia Oriental e Peru; Grupo 2, populações de Roraima e Amazonas Central e oeste) e cinco subgrupos (Subgrupo 1 formado por cinco populações de Rondônia; Subgrupo 2, três populações, Rondônia, oeste do Amazonas e Leste do Pará; subgrupo 3, três populações, Peru, fronteira entre Amazonas e Peru e oeste do Pará; Subgrupo 4, populações de Roraima e oeste do Amazonas; Subgrupo 5, populações do oeste e centro do Amazonas), coincidindo com as áreas de coleta; entretanto, não foi encontrada correlação entre distâncias geográficas e distâncias genéticas.

A manutenção adequada de germoplasma depende, em grande parte, da avaliação e caracterização da variabilidade genética contida no mesmo. Esta avaliação contribui para a prevenção de possíveis perdas genéticas, como as que podem acontecer durante as multiplicações dos acessos coletados,

2.3. Germoplasma vegetal de camu-camu

identificando as populações ou indivíduos que contenham maior variabilidade (Hosbino *et al.*, 2002).

2.4. Marcadores moleculares

Estudos de genética de populações ganharam grande impulso a partir da década de 70, com o advento das técnicas de biologia molecular, especialmente marcadores isoenzimáticos. Porém, foi com o desenvolvimento de metodologias de marcadores moleculares baseados em polimorfismo ao nível de seqüência de DNA que esses estudos ganharam uma poderosa ferramenta para caracterizar e avaliar recursos genéticos, especialmente para entender a estrutura e organização da diversidade genética das populações e seu monitoramento ao longo do tempo. O desenvolvimento e aplicação de tecnologias baseadas em marcadores moleculares fornecem ferramentas únicas, capazes de revelar polimorfismos ao nível de seqüências de DNA, suficientes para discriminar a variação genética existente entre indivíduos e entre populações (Kresovich *et al.*, 1995).

No melhoramento vegetal, os marcadores são utilizados tanto para mapeamento genômico quanto para avaliação da diversidade genética (Figueira & Cascardo, 2001). O emprego de técnicas moleculares na caracterização dos acessos, além de orientar o programa de melhoramento na escolha dos cruzamentos mais adequados, pode proporcionar um grande avanço na racionalização da instalação de novas coleções, permitindo entre outros, a constituição de coleções nucleares, onde cerca de 80% da variação

2.4. Marcadores moleculares

genética de uma coleção pode ser representada por 10% dos acessos (Brown *et al.*, 1989).

Os marcadores moleculares são utilizados para avaliação do grau de heterozigosidade complementar em matrizes de plantas perenes usadas para cruzamentos que buscam o vigor híbrido (Grattapaglia, 1999), baseado na divergência genética para a escolha dos parentais que resultarão em alta heterose e, conseqüentemente, em híbridos com elevada *performance* agrônômica (Livini *et al.*, 1992; Ali *et al.*, 1995; Sekhon & Gupta, 1995).

2.4.1. Microssatélites

Os marcadores microssatélites são marcadores moleculares considerados ideais para as estimativas de parâmetros genéticos de populações e para compreensão de padrões de fluxo gênico e parentesco. Estes marcadores são abundantes e uniformemente distribuídos pelo genoma de plantas. Os microssatélites apresentam como vantagens o caráter co-dominante, elevado polimorfismo e alta reprodutibilidade (Sansavini, 1998; Sosinski *et al.*, 2000), obtenção por amplificação via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), automatização em sistemas multiplex, transferibilidade possível dentro de espécies de um mesmo gênero, após seu desenvolvimento podem ser compartilhados entre diferentes laboratórios (Gaiotto, 2001), possuindo desta forma todas as características desejáveis para serem utilizados em estudos de genética de populações (Powell *et al.*, 1996).

Loci de microssatélites são constituídos por seqüências curtas de DNA repetitivo, com 1 a 6 pb repetidas várias vezes de maneira idêntica e adjacente,

2.4.1. Microssatélites

chamada de repetição em tandem (Goldstein & Schlötterer, 1999). Como outras classes de DNA repetitivo, os microssatélites possuem altas taxas de mutação, numa faixa entre 10^{-3} e 10^{-4} por *locus* por gameta por geração. Estas altas taxas podem surgir através de um mecanismo específico de mutação chamado deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase (Strand *et al.*, 1993; Tautz & Schlötterer, 1994). Outro motivo pela qual a taxa de mutação é alta nos microssatélites é devido ao fenômeno do *crossing-over* desigual, causado pelo pareamento errôneo destas seqüências durante o quiasma. Quando este evento ocorre, podem ocorrer mudanças drásticas, como a perda ou o ganho de um grande número de repetições. Isto acontece porque quando há uma região repetitiva de microssatélite, pode ser formado um grampo durante a sinapse, o que faz com que partes de diferentes comprimentos de cada cromossomo sejam trocadas, resultando em um cromossomo recebendo um fragmento maior, e o homólogo recebendo um menor número de repetições (Oliveira *et al.*, 2006). Em uma grande variedade de organismos, como a levedura, *Drosophila* e humanos, foi demonstrado que as taxas de mutação dos microssatélites estavam positivamente correlacionadas com o número de repetições (Strand *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1996; Jin *et al.*, 1996; Wierdl *et al.*, 1997; Schlötterer *et al.*, 1998).

Os dois principais modelos teóricos que explicam as mutações em microssatélites são o modelo de alelos infinitos e o modelo de mutação passo a passo (*'stepwise'*). No modelo de alelos infinitos, cada mutação randômica cria um novo alelo, alterando o número de repetições; desta forma, a proximidade em termos de números de repetições não indica necessariamente uma maior relação filogenética. Este é o modelo clássico de Wright (1931) no qual são

2.4.1. Microssatélites

utilizadas as estatísticas F. Segundo o modelo 'stepwise', as mutações ocorrem com a adição ou subtração de uma repetição, o que significa que alelos diferindo por apenas uma repetição são mais relacionados que aqueles diferindo por muitas repetições. A medida de diferenciação genética R_{ST} de Slatkin (1995), similar ao F_{ST} de Wright (1951) e ao G_{ST} de Nei (1973), é baseada neste modelo.

Apesar das taxas de mutação serem altas, as seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são conservativas, o que permite a seleção de um par de *primers*. O polimorfismo é baseado nas diferenças de comprimento das seqüências amplificadas, pois o número de repetições em cada microssatélite é altamente variável (Litt & Luty, 1989; Weber & May, 1989; Tautz, 1989; Zucchi, 2002), o que os torna bastante úteis para discriminar diferentes indivíduos (Oliveira *et al.*, 2006).

Os microssatélites foram inicialmente descritos em humanos (Litt & Luty, 1989; Weber & May, 1989), e a seguir, em outras espécies de mamíferos (Love *et al.*, 1990; Johansson *et al.*, 1992; Kemp *et al.*, 1993). Seu potencial como marcador molecular em plantas foi rapidamente conhecido, e então diversos microssatélites têm sido isolados e aplicados a um grande número de espécies vegetais. Em plantas os primeiros motivos de repetição descritos foram $(AC)_n$ e $(AG)_n$ (Condit & Hubbell, 1991). No genoma de plantas superiores a repetição $(AC)_n$ é geralmente menos freqüente do que em mamíferos, sendo o motivo $(AT)_n$ o mais encontrado, seguido por $(A)_n$ e $(AG)_n$ (Akkaya *et al.*, 1995).

Quanto à distribuição dos microssatélites pelo genoma, há aproximadamente um sítio de $(AC)_n$ a cada 360-450 kb em arroz, em comparação com um sítio de $(AC)_n$ a cada 40-80 kb em humanos (McCouch *et*

2.4.1. Microssatélites

al., 1997). Em trigo ocorre um sítio de (AC)_n a cada 700 kb, e no milho, um sítio a cada 100-1000 kb (Condit & Hubbel, 1991). Comparando-se as estimativas de ocorrência do sítio (GA)_n em humanos observa-se que estes motivos são de 2 a 10 vezes mais freqüentes em humanos do que em espécies de plantas, porém, amplamente distribuídos no genoma vegetal (McCouch *et al.*, 1997; Zucchi, 2002).

Devido à expressão co-dominante e ao multi-alelismo, os microssatélites são os marcadores moleculares que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo. Por este motivo, toda e qualquer população segregante pode ser utilizada como população referência para estudos de ligação e mapeamento genético. Assim, não é necessário que a escolha da população para o mapeamento seja feita com base na maximização da distância genética, podendo optar-se pela população mais informativa do ponto de vista das características biológicas ou econômicas de interesse (Milach, 1998).

São considerados os marcadores ideais para construção de mapas genéticos de alta resolução e identificação de *locus* controladores de características de interesse (Brown *et al.*, 1996; Devey *et al.*, 1996), estudos genéticos de conservação e de populações (Powell *et al.*, 1995; Rajora *et al.*, 2000), identificação clonal (Sanchez-Escribano *et al.*, 1999); monitoramento e certificação de cruzamentos controlados, identificação de espécies e híbridos e determinação de paternidade (van de Ven & MacNicol, 1996) e seleção assistida por marcadores (Gupta *et al.*, 1996; Powel *et al.*, 1996; Crouch *et al.*, 1998; Weising *et al.*, 1998).

2.4.1. Microsatélites

Os microsatélites têm sido constatados para várias espécies vegetais, como cacau (Lanaud *et al.*, 1999), pequi (Collevatti *et al.*, 1999), mogno (Lemes *et al.*, 2002), melão (Ritschel, *et al.*, 2002), sumaúma (Brondani *et al.*, 2003), pupunha (Martinez *et al.*, 2002; Billote *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2004), andiroba (Vinson *et al.*, 2005), pinus (Salzer *et al.*, 2009), arnica (Haber *et al.*, 2009) e cana-de-açúcar (Oliveira *et al.*, 2009), entre outros.

Em Myrtaceae, foram isolados microsatélites para as espécies: *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*, a partir das quais foram desenvolvidos 20 *loci* (Brondani *et al.*, 1998); *Melaleuca alternifolia*, conhecida como árvore do chá, que ocorre apenas na Austrália e cujo óleo tem diversas aplicações industriais, com 102 *loci* isolados (Rossetto *et al.*, 1999); *Melaleuca cajuputi*, espécie arbórea que distribui-se no norte da Austrália através da Península da Malásia até a Indochina, com 11 *loci* desenvolvidos (Miwa *et al.*, 2000); *Eucalyptus globulus*, com 12 *loci* isolados (Steane *et al.*, 2001); *E. leucoxylon*, tendo oito *loci* desenvolvidos (Ottewell *et al.*, 2005); *Calothamnus quadrifidus*, arbusto lenhoso endêmico do sudoeste australiano, com 10 *loci* desenvolvidos, (Elliott & Byrne, 2005); *Psidium guajava*, a goiaba, espécie domesticada de grande importância econômica, com 23 *loci* desenvolvidos (Risterucci *et al.*, 2005); *Metrosideros boninensis*, planta endêmica em risco de extinção das Ilhas Bonin, no Japão, sendo isolados nove *loci* (Kaneko *et al.*, 2007); *Metrosideros polymorpha*, espécie arbórea mais dominante no Havaí, da qual foram desenvolvidos 15 *loci* (Crawford *et al.*, 2008) e *Eugenia uniflora*, a pitanga, com nove *loci* (Ferreira-Ramos *et al.*, 2008). Para *Myrciaria dubia* recentemente foram desenvolvidos oito *loci* microsatélites gênicos (EST-SSRs), obtidos a partir de seqüências ESTs (*Expressed Sequence Tags* ou

2.4.1. Microssatélites

Etiquetas de Seqüências Expressas), sintetizadas a partir do cDNA (Rojas G. *et al.*, 2008).

2.5. Diversidade genética em plantas

A diversidade genética tem sido definida como a riqueza de espécies dentro de um ecossistema e também como o nível de variabilidade gênica existente dentro de cada população (Nei, 1973). O desenvolvimento e a manutenção da estrutura genética ocorrem devido às interações de um conjunto complexo de fatores evolucionários, como variações no conjunto gênico, organização destas variações dentro de genótipos, distribuição espacial dos genótipos, sistema de reprodução, dispersão das progênies, seleção, deriva, mutação, eventos casuais e processos de crescimento, mortalidade e reposição dos indivíduos que darão origem a futuras populações (Hamrick, 1983; Loveless & Hamrick, 1984; Holsinger & Gottlieb, 1991; Hamrick *et al.*, 1992).

A variabilidade genética intrapopulacional tem sido quantificada em termos de números de alelos por *locus* (A), porcentagem de *locus* polimórficos (P), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) sob equilíbrio de Hardy-Weinberg e índice de fixação (f) (Hamrick, 1983). Estas estimativas caracterizam e comparam os níveis de diversidade genética dentro de cada população. Além disso, o índice de fixação (f) tem sido utilizado como uma medida de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro de cada população (Rodrigues, 2006).

2.5. Diversidade genética em plantas

A heterozigosidade é considerada uma medida adequada para quantificar a variação (Weir, 1996); entretanto, a frequência de heterozigotos também é um importante indicador da diversidade genética, uma vez que cada heterozigoto carrega alelos diferentes, e, portanto, representa melhor a diversidade existente (Weir & Basten, 1990).

A estimativa da frequência de um alelo particular em uma população, chamada de frequência gênica ou alélica, é considerada fundamental em estudos evolutivos, pois a mudança genética de uma população pode ser avaliada pela mudança nas duas frequências gênicas (Nei, 1987).

De acordo com Loveless & Hamrick (1984), as populações de plantas não são organizadas aleatoriamente em grupos de genótipos, mas são estruturadas no espaço e no tempo. Essa estrutura pode ser expressa entre plantas geograficamente distintas, dentro de um grupo local de plantas, ou mesmo na progênie dos indivíduos. Portanto, em situações em que há uma seleção diferenciada em estágios do ciclo de vida, podem ocorrer diferenças genéticas significantes entre classes de idade, refletindo numa alteração da estrutura genética no tempo. Em outra situação, a adaptação em um microambiente é uma característica comum de populações de plantas e sua existência pode levar a uma distribuição não aleatória de genótipos dentro de populações, o que leva a uma alteração da estrutura no espaço.

A estrutura genética é o resultado da ação conjunta de forças evolutivas como a mutação, migração, seleção e deriva que operam dentro de um contexto histórico e biológico de cada espécie de planta. Essas forças violam as condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg. A mutação, a migração e a seleção tendem a mudar, de maneira previsível, a frequência gênica tanto em

2.5. Diversidade genética em plantas

quantidade como em direção. Essa estrutura pode se manifestar entre populações geograficamente distintas dentro de um grupo de plantas, ou mesmo nos indivíduos de uma progênie.

Em resumo, a estrutura genética pode ser definida como sendo a distribuição não aleatória de alelos ou de genótipos no espaço e no tempo, prescindindo dos processos meióticos que também podem afetar as freqüências alélicas e genotípicas.

Alguns fatores ecológicos que influenciam a estrutura genética das populações podem ser determinados por outros aspectos de sua história de vida, como a estratégia reprodutiva, o sistema reprodutivo, o mecanismo de polinização, a forma de dispersão da semente, existência de dormência da semente, o tamanho e a densidade da população (Loveless & Hamrick, 1984; Garnier-Géré & Ades, 2001; Crnokrak & Merila, 2002; Latta & McKay, 2002; Latta, 2004).

Para medir a estrutura genética de populações, têm sido utilizadas comumente três metodologias: as estatísticas F (Wright, 1951), os coeficientes de coancestria de Cockerham (Cockerham, 1969) e a diversidade gênica (Nei, 1973). As estatísticas F fornecem os índices de fixação de alelos ou coeficiente de endogamia para o conjunto das populações (F_{IT}), média intrapopulacional (F_{IS}) e interpopulacional (F_{ST}), com base em medidas de probabilidade de identidade por descendência (Wright, 1965; Nei, 1977). A análise de Cockerham baseia-se na variância das freqüências gênicas em diferentes níveis hierárquicos, além de possibilitar a obtenção de estimativas de endogamia, a partir de uma base não viesada (Cockerham, 1969; Weir, 1996). A diversidade gênica em populações subdivididas permite a comparação da

2.5. Diversidade genética em plantas

variabilidade genética contida entre e dentro das populações, os níveis de heterozigosidade esperados para o total e a média das populações, e a obtenção de uma estimativa de divergência a partir de uma base diferente das que fundamentam as duas estimativas anteriores (Nei, 1973; 1977; 1987).

Para a avaliação da variabilidade genética em germoplasma é necessária a disponibilidade de marcadores polimórficos e seletivamente neutros do ponto de vista do efeito ambiental, que possibilitem a medição da estrutura genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akkaya, M. S.; Schoemaker, R. C.; Specht, J. E.; Bhagwat, A. A.; Cregan, P. B. 1995. Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. *Crop Science*. 35(5): 1439-1445.
- Ali, M.; Copeland, L.O.; Elias, S.G.; Kelly, J.D. 1995. Relationship between genetic distance and heterosis for yield and morphological traits in winter canola (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 91(1): 118-121.
- Alves, R.E.; Borges, M.F.; Moura, C.F.H. 2000. Camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh). In: Alves, R.E; Filgueiras, H.A.C.; Moura, C.F.H. *Caracterização de frutos Nativas da América Latina*. Jaboticabal, FUNEP, p.23-26.
- Andrade. J. S. 1993. *Uso de atmosfera modificada e refrigeração para manutenção da qualidade pós-colheita do camu-camu (Myrciaria dubia (H.B.K.)McVaugh)*. Tese de doutorado. 50p.
- Andrade, J.C.; Galezi, M.A.M.; Aragão, C.G.; Ferreira, S.A.N. 1995. Changes in the concentration of total vitamin C during maturation and ripening of camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruits cultivated in the upland of Brazilian Central Amazon. *Acta Horticulture*. 370: 177-180.
- Barbosa, M.L.L., Acioli, A.N.S.; Oliveira, A.N.; Silva, N.M.; Canto, S.L.O. Ocorrência de *Tuthillia cognata* Hodkinson Brown & Burckhardt, 1986 (Hemiptera: Homoptera, Psyllidae) em plantios experimentais de camu-camu *Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh em Manaus (Amazonas, Brasil). 2004. *Acta Amazonica*, 34 (1): 115-119.
- Billotte, N.; Couvreur, T.; Marseillac, N.; Brottier, P.; Perthuis, B.; Vallejo, M.; Noyer, J-L.; Jacquemoud-Collet, J-P.; Risterucci, A-M.; Pintaud, J-C. 2004. A new set of microsatellite markers for the peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth); characterization and across-taxa utility within the tribe Cocoeae. *Molecular Ecology Notes*. 4: 580-582.
- Brondani, R. P. V.; Brondani, C.; Tarchini, R.; Grattapaglia, D. 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theoretical and Applied Genetics*. 97: 816-827.

- Brondani, R.P.V.; Gaiotto, F.A.; Missiaggia, A.A.; Kirst, M.; Gribel, R.; Grattapaglia, D. 2003. Microsatellite markers for *Ceiba pentandra* (Bombacaceae), an endangered tree species of the Amazon forest. *Molecular Ecology Notes*. 3: 177-179.
- Brown, A. H. D.; Burdon, J. J.; Jarosz, A. M. 1989. Isozyme analysis of plant mating systems. *In: Douglas, E. S.; Soltis, P. S. (Eds.) Isozymes in plant biology*. London: Chapman and Hall. p.73-86.
- Brown, S. M.; Hopkins, M. S.; Mitchell, S. E.; Senior, M. L.; Wang, T. Y., Duncan, R. R.; Gonzalez-Candelas, F.; Kresovich, S. 1996. Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Theoretical and Applied Genetics*. 93(1-2): 190-198.
- Calzada Benza, J.C. 1980. *143 Frutales nativos*. Librería El Estudiante. La Molina, 314p.
- Calzada Benza, J. C.; Rodríguez, R. J. 1980. *Investigaciones sobre camu-camu (Myrciaria paraensis Berg)*. Iquitos: INIA. 15p.
- Castañeda, R. R. 1961. *Frutas Silvestres de Colombia*. Bogotá: Author. 300p.
- Charlesworth, D.; Charlesworth, B.; Morgan, M.T. 1995. The pattern of neutral molecular variation under the background selection model. *Genetics*. 141: 1619-1632.
- Chávez Flores, W. B. 1988. A importância econômica do camu-camu. *Toda fruta*. 3(27): 37-7.
- Cockerham, C.C. 1969. Variance of gene frequency. *Evolution*. 23: 72-84.
- Collevatti, R.G.; Brondani, R.V.; Grattapaglia, D. 1999. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. *Heredity*. 83: 748-756.
- Condit, R; Hubbell, S. P. 1991. Abundance and DNA-sequence of 2-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome*. 34(1): 66-71.
- Conte, R. 2004. Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. Submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ. Piracicaba, SP. 124p.

- Crawford, N. G.; Hagen, C.; Sahli, H. F.; Stacy, E. A.; Glenn, T. C. 2008. Fifteen polymorphic microsatellite DNA loci from Hawaii's *Metrosideros polymorpha* (Myrtaceae: Myrtales), a model species for ecology and evolution. *Molecular Ecology Resources*. 8: 308–310.
- Crnokrak, P; Merila, J. 2002. Genetic population divergence: markers and traits. *Trends in Ecology and Evolution*. 17: 501.
- Crouch, H. K.; Crouch, J. H.; Jarret, R. L.; Cregan, P. B.; Ortiz, R. 1998. Segregation at microsatellite loci in haploid and diploid gametes of *Musa*. *Crop Science*. 38: 211-217.
- Devey, M. E.; Bell, J. C.; Smith, D. N.; Neale, D. B., Moran, G. F. 1996. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 92: 673-679.
- Elliott, C. P.; Byrne, M. 2005. Isolation and characterization of microsatellites in the woody shrub, *Calothamnus quadrifidus* (Myrtaceae). *Molecular Ecology Notes*. 5: 757–759.
- Falcão, M.A.; Ferreira, S.A.N.; Chávez Flores, W.B.; Clement, C.R. 1993. Aspectos fenológicos e ecológicos do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) na terra firme da Amazônia Central. In: *Aspectos fenológicos, ecológicos e de produtividade de algumas espécies na Amazonia brasileira: araçá-boi (Eugenia stipitata McVaugh), biriba (Rollinia mucosa (Jacq.) Baill), camu-camu (Myrciaria dubia (H.B.K.) McVaugh), cupuaçu (Theobroma grandiflorum (Willd. Ex Spreng.) Schum) e graviola (Annona muricata L.)*. p. 57-65.
- Ferreira, S.A.N. 1986. Camu-camu. Informativo da Sociedade Brasileira de fruticultura, Campinas, 5(2): 11-2.
- Ferreira-Ramos, R.; Laborda, P. R.; Santos, M. O.; Mayor, M. S.; Mestriner, M. A.; Souza, A. P.; Alzate-Marin, A. L. 2008. Genetic analysis of forest species *Eugenia uniflora* L. through of newly developed SSR markers. *Conservation Genetics*. 9:1281–1285.
- Figueira, A. V. O.; Cascardo, J. C. M. 2001. Marcadores moleculares no melhoramento. In: Dias, L. A. S. (Ed.) *Melhoramento genético do cacauzeiro*. Viçosa: FUNAPE, UFG. p.385-438.

- Gaiotto, F. A. Inferências sobre herança quantitativa e estrutura genética em populações naturais de *Euterpe edulis* Mart. Utilizando marcadores microssatélite. 2001. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ. Piracicaba, SP. 122p.
- Garnier-Géré, P.H.; Ades, P.K. 2001. Environmental surrogates for predicting and conserving adaptive genetic variability in tree species. *Conservation Biology*. 15: 1632-1644.
- Goldstein, D. B.; Schlötterer, C. 1999. *Microsatellites: Evolution and Applications*. New York: Oxford University Press. 359p.
- Grattapaglia, D. 1999. Molecular markers for forest trees: where are we going? In: Borém, A.; Giúdice, M.P.; Sakiyama, N.S. (Eds.) *Plant breeding in the turn of the millennium*. Viçosa: Universidade de Viçosa. p. 79-101.
- Gupta, P.K.; Balyan, P.C.; Sharma, P.C.; Ramesh, B. 1996. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. *Current Science*. 70: 45-54.
- Gutierrez, R. A. 1969. *Especies frutales nativas de la selva del Peru: estudio botánico e de propagación de semillas*. Tesis (Ingeniero Agrónomo) – Universidad Nacional Agraria.
- Haber, L. H.; Cavallari, M. M.; Santos, F. R. C.; Marques, M. O. M.; Gimenes, M. A.; Zucchi, M. I. 2009. Development and characterization of microsatellite markers for *Lychnophora pinaster*: a study for the conservation of a native medicinal plant. *Permanent Genetic Resources Note*. 811-814.
- Hamrick, J.L. 1983. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: Schnewald-Cox, C.M.; Chambers, S.M.; MacBride, B.; Thomas, L. (Eds.) *Genetic and conservation*. Menlo Park: The Benjamin/Cummings Publishing Company. p. 335-348.
- Hamrick, J.L.; Godt, M.J.W.; Murawski, M.D.A.; Loveless, M.D. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in wood plant species. *New Forests*. 6: 95-124.
- Holsinger, K.E.; Gottlieb, L.D. 1991. Conservation of rare and endangered plants: principles and prospects. In: Falk, D.A.; Holsinger, K.E. (Eds.) *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, New York, p. 95-124.

Referências bibliográficas

- Hosbino, A.A.; Palmieri, D.A.; Bravo, J.P.; Pereira, T.E.B.; Lopes, C.R.; Gimenes, M.A. 2002. Marcador microsatélite na conservação de germoplasma vegetal. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*. 29: 146-150.
- Jin, L.; Macaubas, C.; Hallmayer, J.; Kimura, A.; Mignot, E. 1996. Mutation rate varies among alleles at a microsatellite locus: phylogenetic evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93(26): 15285-15288.
- Johansson, M.; Ellegren, H.; Andersson L. 1992. Cloning and characterization of highly polymorphic porcine microsatellites. *Journal of Heredity*. 83: 196-198.
- Justi, K.C.; Visentainer, J.V.; Souza, N.E.; Matsushita, M. 2000. Nutritional composition and vitamin C stability in stored camu-camu (*Myrciaria dubia*) pulp. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 50(4): 405-408.
- Kaneko, S.; Yuji Isagi, Y.; Nobushima, F. 2007. Development of microsatellite markers for *Metrosideros boninensis* (Myrtaceae), an endangered endemic plant species from the Bonin Islands, Japan. *Conservation Genetics*. 8:753–755.
- Karasawa, M.M.G. 2005. Análise da estrutura genética de populações e sistema reprodutivo de *Oryza glumaepatula* por meio de microssatélites. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ. Piracicaba, SP. 91p.
- Keel, S.H.K.; Prance, G.T. 1979. Studies of vegetation of a white-sand black-water igapo (Rio Negro, Brasil). *Acta Amazonica*, 9 (1): 654-55.
- Kemp, S. J.; Brezinsky, L.; Teale, A. J. 1993. A panel of bovine, ovine and caprine polymorphic microsatellites. *Animal Genetics*. 24: 363-365.
- Kresovich, S.; Szewc-McFadden, A. K.; Blick, S. 1995. Abundance and characterization of simple-sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapessed). *Theoretical and Applied Genetics*. 91: 206-211.
- Lanaud, C.; Risterucci, A. M.; Pieretti, I.; Falque, M.; Bouet, A.; Lagoda, P. J. L. 1999. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. *Molecular Ecology*. 8: 2141-2143.

Referências bibliográficas

- Latta, R.G.; McKay, J.K. 2002. Genetic population divergence: markers and traits – response. *Trends in Ecology and Evolution*. 17: 501-502.
- Latta, R.G. 2004. Gene flow, adaptative population divergence and comparative population structure across loci. *New Phytologist*. 161: 51-58.
- Lemes, M.R.; Brondani, R.P.V.; Grattapaglia, D. 2002. Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis of Mahogany, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), a threatened neotropical timber species. *The Journal of Heredity*. 93(4): 287-290.
- Litt, M. & Luty, J. A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*. 44: 397-401.
- Livini, C.; Ajmone Marsan, P.; Melchinger, A.E.; Messmer, M.M.; Motto, M. 1992. Genetic diversity of maize inbred lines within and among heterotic groups revealed by RFLP. *Theoretical and Applied Genetics*. 84: 17-25.
- Love, J. M.; Knight, A. M.; McAleer, M. A.; Todd, J. A. 1990. Towards construction of a high-resolution map of the mouse genome using PCR-analysed microsatellites. *Nucleic Acids Res*. 21: 1111-1115.
- Loveless, M.D. & Hamrick, J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*. Palo Alto. 15: 65-95.
- McVaugh, R. 1958. Flora of Peru IV – 2. *Field Museum of Natural History – Botany*.13: 780-781.
- McVaugh, R. 1963. Tropical American Myrtaceae. *Fieldiana – Botany*. 29(8): 393-532.
- McVaugh, R. 1969. Botany of the Guyana highland. Part VIII. *Memoirs of the New York Botanical Garden*. 18(2): 55-286.
- Maeda, R.N.; Andrade, J.S. 2003. Aproveitamento do camu-camu (*Myrciaria dubia*) para produção de bebida alcoólica fermentada. *Acta Amazonica*, 33(3):489-496.
- Maeda, R.N.; Pantoja, L.; Yuyama, L.K.O.; Chaar, J.M. 2006. Determinação da Formulação e caracterização do Néctar de camu-camu (*Myrciaria dubia*

- McVaugh). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas - SP, 26(1):70-74.
- Martinez, A.K.; Gaitan-Solis, E.; Duque, M.C.; Bernal, R.; Tohme, J. 2002. Microsatellite loci in *Bactris gasipaes* (Arecaeae): Their isolation and characterization. *Molecular Ecology Notes*. 2: 408–410.
- Matsuura, F.C.A.U.; Cardoso, R.L.; Oliveira, J.R.P.; Oliveira, J.A.B.; Santos, D.B. 1998. Determinações físico-químicas de frutos de genótipos de acerola (*Malpighia glabra* L.). Congresso Brasileiro de Fruticultura, 15. Poços de caldas, 18-23/10-1998. *Resumos...* Lavras, SBF, p. 65.
- McCouch, S. R.; Chen, X. L.; Panaud, O.; Temnykh, S.; Xu, Y.; Cho, Y. G.; Huang, N.; Ishii, T.; Blair, M. 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Molecular Biology*. 35(1-2): 89-99.
- Mera, P. A. S. 1987. Camu-camu *Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh. In: Prance G. T. *Botânica econômica de algumas espécies amazônicas*. Manaus: INPA, FUA. s.p.
- Milach, S. 1998. *Marcadores Moleculares em Plantas*. Porto Alegre: Sandra Milach. 141p.
- Miwa, M.; Tanaka, R.; Shinone, M.; Kojima, K.; Hogetsu, T. 2000. Development of polymorphic microsatellite markers in a tropical tree species, *Melaleuca cajuputi* (Myrtaceae). *Molecular Ecology*. 9: 629-644.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 70(12): 3321-3323.
- Nei, M. 1977. F-statistic of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics*. 41: 225-330.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York, NY. 512p.
- Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*. 13: 1143–1155.

Referências bibliográficas

- Oliveira, E. J.; Pádua, J. G.; Zucchi, M. I.; Vencovsky, R.; Vieira, M. L. C. V. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*. 29 (2): 294-307.
- Oliveira, K.M.; Pinto, L.R.; Marconi, T.G.; Mollinari, M.; Ulian, E.C.; Chabregras, S.M.; Falco, M.C.; Burnquist, W.; Garcia, A.A.F.; Souza, A.P. 2009. Characterization of new polymorphic functional markers for sugarcane. *Genome*. 52: 191-209.
- Ottewell, K. M.; Donnellan, S. C.; Moran, G. F.; Paton, D. C. 2005. Multiplexed Microsatellite Markers for the Genetic Analysis of *Eucalyptus leucoxylon* (Myrtaceae) and Their Utility for Ecological and Breeding Studies in other *Eucalyptus* Species. *Journal of Heredity*. 96(4):445-451.
- Payn, K. G.; Dvorak, W. S.; Janse, B. J. H.; Myburg, A. A. 2008. Microsatellite diversity and genetic structure of the commercially important tropical tree species *Eucalyptus urophylla*, endemic to seven islands in eastern Indonesia. *Tree Genetics & Genomes*. 4:519–530.
- Peters, C. M.; Vasquez, A. 1988. Estudios ecológicos de camu-camu (*Myrciaria dubia*). I. Producción de frutos en poblaciones naturales. *Acta Amazonica*. 16-17: 161-174.
- Picón, B. C. P.; Flor, B. F. D.; Trueba, C. P. 1987. *Descriptores de camu-camu*. (Informe Técnico 8) Lima: Inipa. 55p.
- Pinedo, M. 2004. [Camu-camu, una nueva línea de producción orgánica de vitamina C, en adopción por el poblador amazónico](#). *LEISA Revista de Agroecología*. 20(1): 13-15.
- Powell, W.; Morgante, M.; McDevitt, R.; Vendramin, G. G.; Rafalski, J. A. 1995. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: applications to population genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 92: 7759-7763.
- Powell, W.; Machray, G. C.; Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Science*. 1: 209-245.
- Rajora, O. P.; Rahman, M. H.; Buchert, G. P.; Dancik, B. P. 2000. Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) in Ontario. *Molecular Ecology*. 9: 339-348.

Referências bibliográficas

- Risterucci, A.M.; Duval, M.F.; Rohde, W.; Billotte, N. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. *Molecular Ecology Notes*. 5(4): 745-748.
- Ritschel, P.S.; Buso, G.S.C.; Buso, J.A.; Ferreira, M.E. 2002. Towards the development of a microsatellite marker based in genetic map of melon. In: *The International Conference on the Status of Plant, Animal & Microbe Genomes Research*. San Diego. Plant, Animal & Microbe Genomes. p. 129.
- Roca, N.A. 1965. *Estudio químico bromatológico de la Myrciaria paraensis* Berg. Tese de Doutorado. Lima, Universidade Nacional Mayor de San Marcos, Faculdade de Química. 56p.
- Rodrigues, D. P.; Vinson, C.; Ciampi, A. Y.; Farias, I. P.; Lemes, M. R.; Astolfi-Filho, S.; Clement, C. R. 2004. Novel microsatellite markers for *Bactris gasipaes* (Palmae). *Molecular Ecology Notes*. 4: 575–576.
- Rodrigues, D. P. 2006. Diversidade genética e sistema de reprodução em progenies elites de pupunheira inerme (*Bactris gasipaes* Kunth) com marcadores microssatélites: implicações para o melhoramento do palmito. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Manaus, AM. 109p.
- Rodrigues, R.B.; Papagiannopoulos, M.; Maia, J.G.S.; Yuyama, K.; Marx, F. 2006. Antioxidant capacity of camu-camu [*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh] pulp. *Ernährung/Nutrition*, 30(9):357-362.
- Rojas Gonzalez, S. Análise da variabilidade genética de acessos do banco de germoplasma de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) do INPA, utilizando marcadores microssatélites EST (EST-SSRs). 2007. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Manaus, AM. 106p.
- Rojas G., S.; Rodrigues, D.; Lima, M.; Astolfi-Filho, S. 2008. Desenvolvimento e mapeamento de microssatélites gênicos (EST-SSRs) de camu-camu (*Myrciaria dubia* [H.B.K.] McVaugh). *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnologia Agropecuaria*. 9(1): 14-21.
- Rossetto, M.; Slade, R. W.; Barvestock, P. A.; Henry, R. J.; Lee, L. S. 1999. Microsatellite variation and assessment of genetic structure in tea tree (*Melaleuca alternifolia* – Myrtaceae). *Molecular Ecology*. 8: 633-643.

- Salzer, K.; Sebastiani, F.; Gugerli, F.; Buonamici, A.; Vendramin, G. G. 2009. Isolation and characterization of polymorphic nuclear microsatellite loci in *Pinus cembra* L. 858 *Permanent Genetic Resources Note*.
- Sánchez-Escribano, E. M.; Martín, J. P.; Carreno, J.; Genis, J. L. 1999. Use of sequence-tagged microsatellite site markers for characterizing table grape cultivars. *Genome*. 42: 87-93.
- Sansavini, S. 1998. Biotecnologie frutticole: le nuove frontiere delle ricerche per il miglioramento genetico e la propagazione delle piante da frutto. *Frutticoltura*. Bologna, 5: 75-81.
- Schlötterer, C.; Ritter, R.; Harr, B.; Brem, G. 1998. High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. *Molecular Biology and Evolution*. 15(10): 1269-1274.
- Sekhon, M.S. & Gupta, V.P. 1995. Genetic distance and heterosis in Indian mustard: developmental isozymes as indicators of genetic relationships. *Theoretical and Applied Genetics*. 91: 1148-1152.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*. 139: 457-462.
- Sosinski, B. Gannavarapu, M; Harger, L. D. 2000. Characterization of microsatellite markers in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Theoretical and Applied Genetics*. New York, 101: 421-428.
- Steane, D. A.; Vaillancourt, R. E.; Russell, J.; Powell, W.; Marshall, D.; Potts, B.M. 2001. Development and characterisation of microsatellite loci in *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). *Silva Genetica*. 50(2): 89-91.
- Steane, D. A.; Conod, N.; Jones, R. C.; Vaillancourt, R. E.; Bradley M. Potts, B. M. 2006. A comparative analysis of population structure of a forest tree, *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), using microsatellite markers and quantitative traits. *Tree Genetics & Genomes*. 2: 30-38.
- Strand, M.; Prolla, T.A.; Liskay, R.M.; Petes, T.D. 1993. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature*. 365: 274-276.
- TACO. *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos*. NEPA-UNICAMP. Versão II. 2 ed. Campinas, SP:NEPA-UNICAMP, 2006. 113p.

Referências bibliográficas

- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17: 6463-6471.
- Tautz, D.; Schlötterer, C. 1994. Simple sequences. *Current Opinion in Genetics & Development.* 4: 832-837.
- Teixeira, A.S.; Chaves, L.S; Yuyama, K. 2004. Esterases no exame da estrutura populacional de Camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh-Myrtaceae). *Acta Amazonica.* 34(1):89-96.
- van de Ven, W. T. G.; McNicol, R. J. 1996. Microsatellites as DNA markers in *Stika spruce*. *Theoretical and Applied Genetics.* 93: 613-617.
- Varshney, R. K.; Graner, A.; Sorrells, M. E. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *TRENDS in Biotechnology.* 23(1).
- Vásquez, A. 2000. *El camu-camu: cultivo, manejo e investigaciones*. Peru. 218 pp.
- Villachica, H.L. 1996. El Cultivo del camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. McVaugh) en la Amazônia Peruana. Tratado de Cooperación Amazônica. TCA. Secretaria pro-tempore.
- Vinson, C.C.; Azevedo, V.C.R.; Sampaio, I. Ciampi, A.Y. 2005. Development of microsatellite markers for *Carapa guianensis* (Aublet), a tree species from amazon forest. *Molecular Ecology Notes.* 5: 33-34.
- Yuyama, K.; Aguiar, J.P.L.; Yuyama, K.L.O. 2002a. Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina C. *Acta Amazonica*, 32(1): 169-174.
- Yuyama, K. 2002b. Domesticação de germoplasma de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) para uso em agroindústria na Amazônia. In: *Livro de resultados dos Projetos de Pesquisa Dirigida (PPDs)*. SPC&T/PPG7. MCT/SCT, p.149-153.
- Yuyama, L.K.O.; Aguiar, J.P.L.; Yuyama, K.; Lopes, T.M.; Favaro, D.I.T.; Bergl, P.C.P.; Vasconcellos, M.B.A. 2003. Teores de elementos minerais em algumas populações de camu-camu. *Acta Amazonica.* 33(4):549-554.
- Weber, J. L. & May, P. E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics.* 44: 388-396.

Referências bibliográficas

- Weir, B. S. 1996. *Genetic data analysis: methods for discrete genetic data*. Sunderland: Sinauer Associates. 377p.
- Weir, B.S. & Basten, C.J. 1990. Sampling strategies for DNA sequence distance. *Biometrics*. 26: 551-582.
- Weising, K.; Winter, P.; Huttel, B.; Kahl, G. 1998. Microsatellite markers for molecular breeding. *Journal of Crop Production*. 1: 113-143.
- Wierdl, M.; Dominsk, A. M.; Peters, T. D. 1997. Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite. *Genetics*. 146(3): 769-779.
- Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*. 16: 97-159.
- Wright, S. 1951. Systems of mating. *Genetics*. 6: 111-178.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annual Eugenics*. 15: 323-354.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution*. 19: 395-420.
- Zapata, S.M. & Dufour, J.P. 1993. Camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh): chemical composition of fruit. *J. Sci. Food Agric*. 61: 349-351.
- Zucchi, M. I. 2002. Análise da estrutura genética de *Eugenia desenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ. Piracicaba, SP. 130p.

**ISOLAMENTO E
CARACTERIZAÇÃO DE
MICROSSATÉLITES EM
CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*
(H.B.K.) MCVAUGH)**

3 – ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROSSATÉLITES EM CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) MCVAUGH)

RESUMO

Loci microssatélite genômicos foram desenvolvidos para análise da variação genética em camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh). Uma biblioteca genômica enriquecida foi construída, da qual foram seqüenciados 192 clones, destes 80 continham seqüências de microssatélites, sendo os motivos mais comuns, GA e CT, e na sua maioria classificados como perfeitos simples, variando num tamanho de sete a 23 repetições, sendo 98,1% dinucleotídeos e 1,9% trinucleotídeos. Das seqüências contendo microssatélites, 36 (45%) apresentaram tamanhos e posição de seqüência repetitiva adequados para o desenho dos *primers* na região flanqueadora, sendo 14 seqüências selecionadas para desenho dos pares de *primers*. Destes, 12 (85,7 %) tiveram sucesso na amplificação, produzindo fragmentos do tamanho esperado, com nove (75 %) demonstrando polimorfismo. Entre os *primers* polimórficos, o número de alelos por *locus* variou de três a 10, com uma média de 6,9 alelos por *locus*. A heterozigosidade observada (H_O) variou de 0,211 a 0,897, apresentando uma média de 0,531. A heterozigosidade esperada (H_E) variou de 0,39 a 0,832, com média de 0,679. Os valores de poder de discriminação estimado (D_L) foram maiores que 0,75 em seis *loci*, estando próximo a este valor em um *locus*. Os valores de D foram superiores em sete *loci*, demonstrando alto conteúdo de informação e eficiência em detectar a variação genética. Os microssatélites descritos neste estudo são úteis para análises de diversidade e estrutura genética em populações de camu-camu, possibilitando a avaliação da variabilidade genética e organização do germoplasma.

Palavras-chave: *Myrciaria dubia*, marcadores microssatélite, diversidade genética, Myrtaceae

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MICROSATELLITES IN CAMU-CAMU (*MYRCIARIA DUBIA* (H.B.K.) MCVAUGH)

ABSTRACT

Genomic microsatellite *loci* were developed for variability genetic analysis of camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh). An enrichment genomic library was constructed and 192 clones were sequenced, of which 80 containing microsatellite sequences, with the GA and CT motifs being the most common, and in the majority were classified in simple perfects, ranging in size seven to 23 repeats, of these 98.1% were dinucleotides and only 1.8% trinucleotides. From the sequences containing microsatellites, 16 (45%) had size and good repeat sequence position for *primers* design in flanking regions, and 14 sequences were choose for primer pair design. Of these, 12 (85.7%) had success in the amplification and produced fragment of the expected size, with nine of them showing polymorphism. From the polymorphic primers the alleles number per *locus* ranged from three to 10, with a mean of 6.9 alleles per *locus*. The observed heterozygosity (H_O) ranged from 0.211 to 0.897, presented a mean of 0.531. The expected heterozygosity (H_E) ranged from 0.39 to 0.832, with a mean of 0.679. The estimated discriminating power (D_L) were greater than 0.75 in six *loci*, with near value in one more *locus*. The D values were higher in seven *loci*, confirming high information content and efficiency on detecting genetic variation. The microsatellite described in this study are useful in camu-camu diversity analysis and genetic structure, in an enable evaluation genetic variation and germplasm organization.

Key-words: *Myrciaria dubia*, microsatellite markers, genetic diversity, Myrtaceae

3.1. INTRODUÇÃO

O camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) é endêmico da região Amazônica, destacando-se entre todas as espécies frutíferas conhecidas pelo alto conteúdo de vitamina C existente em seus frutos, superior às demais espécies. Apesar de pouco utilizada no país, já possui mercado consumidor internacional estabelecido, no qual é consumido principalmente na forma de bebidas.

Os frutos de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) são os que possuem o maior conteúdo de ácido ascórbico conhecido. No entanto, a planta é ainda não-domesticada, e a caracterização da variabilidade genética pode acelerar o programa de melhoramento genético e expandir o aproveitamento da espécie. Esta avaliação pode ser mensurada com o uso de marcadores moleculares altamente polimórficos, como os microssatélites. Para camu-camu foram desenvolvidos marcadores EST-SSRs (Rojas G., 2008), mas não existiam até o momento marcadores microssatélites genômicos, que são mais apropriados para estudos genéticos de população.

Os microssatélites podem ser extremamente informativos em estudos de genética populacional, podendo determinar relações dentro e entre populações e estruturação genética (Zhou *et al.*, 1999; Zane *et al.*, 2002; Steane *et al.*, 2006; Payn *et al.*, 2008).

Quando a técnica para isolamento de microssatélites foi desenvolvida, era extremamente onerosa, demorada e relativamente ineficiente para organismos que possuem menor frequência de microssatélites que os mamíferos, como as plantas (Billot *et al.*, 1998; Soranzo *et al.*, 1998; Ouborg *et*

al., 2000; Hughes *et al.*, 2002; Latouche-Hallé *et al.*, 2002; Zane *et al.*, 2002; Squirrell *et al.*, 2003). No entanto, foram surgindo novos e eficientes métodos, como a construção de bibliotecas genômicas enriquecidas (Edwards *et al.*, 1996), o que levou à redução dos custos. Desta forma, foi viabilizada a aplicação dos microssatélites para várias espécies, incluindo organismos que não são modelos (Oliveira *et al.*, 2006), abrindo a possibilidade de caracterização genética de espécies das quais não havia qualquer conhecimento prévio de suas seqüências (Edwards *et al.*, 1996; Rossetto *et al.*, 1999).

Este trabalho tem como objetivo desenvolver e caracterizar marcadores microssatélites para *Myrciaria dubia* a partir de biblioteca genômica enriquecida.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

Para o isolamento de microssatélites a partir da biblioteca genômica enriquecida foi utilizado DNA de um acesso por população de Uatumã, Cauamé e Candeias. A caracterização dos *loci* desenvolvidos foi realizada utilizando 41 acessos da população de Uatumã. O DNA foi extraído a partir de 100 mg de folhas, sendo estas maceradas na presença de nitrogênio líquido e foi então seguido o método CTAB 2% descrito por Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987) com modificações. Após a extração, o DNA foi quantificado em eletroforese com gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

3.2.1. Desenvolvimento dos microssatélites a partir de Biblioteca Enriquecida

3.2.1.1. Construção da biblioteca enriquecida

O desenvolvimento dos microssatélites foi realizado de acordo com protocolos descritos por Farias *et al.* (2003). A enzima de restrição *Sau3AI* foi utilizada para digerir o DNA em uma condição de 37°C por 240 min, visando obter fragmentos de DNA genômico entre 200 a 1000 pares de bases.

Os produtos da restrição foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, contendo 0,1 µg/ml de brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta. No gel de agarose os fragmentos de 200 a 800 pb foram selecionados e purificados com kit de purificação GFX (GE Healthcare). A estes fragmentos foram ligados adaptadores no sítio de restrição da enzima

(Er1Bh1*Blunt* – 5' CGG AAT TCA GTG GAT CCT GCC 3'; Er1Bh1GATC*Sticky* – 5' GAT CGG CAG CAT CCA CTG AAT TCC 3').

A sonda (CT₁₀) foi marcada em reação contendo sonda-oligo (40 µM), tampão terminal transferase (5X), Biotina dUTP (1 mM) e terminal transferase (20 U/µl), formando um complexo biotina-sonda. Este complexo foi então ligado às esferas magnéticas *Dynabeads*[®] *M-280 streptavidin* (Dynal Biotech, Hamburg). Este segundo complexo (sonda-biotina-avidina-beads) foi utilizado na etapa de hibridização, onde se ligaram às repetições de microssatélites correspondentes do DNA genômico.

A seleção dos fragmentos ricos em repetições, realizada pela ligação dos fragmentos digeridos de DNA ao complexo sonda-biotina-dynabeads, foi efetuada por protocolo com as seguintes etapas: (1) lavagem das esferas magnetizadas que foram misturadas aos oligonucleotídeos biotinizados formando um complexo esferas-oligonucleotídeos; (2) hibridização do DNA digerido pré-desnaturado (10 min a 95°C) junto com a solução esferas-oligonucleotídeos para a hibridização por 4 h; (3) lavagem do complexo para o isolamento do DNA contendo as repetições de microssatélites.

Os fragmentos de DNA enriquecido foram amplificados via PCR, e os produtos purificados usando kit de purificação para produto de PCR (Amersham, Quiack).

O produto do PCR foi então ligado a um vetor de clonagem imediatamente após a purificação (Sistema TOPO TA cloning Vector Kit[®] – Invitrogen) e inseridos, por meio de eletroporação, nas células competentes fornecidas pelo próprio kit.

3.2.1.2. Seleção, seqüenciamento de clones positivos e desenho de primers

As células transformadas foram cultivadas em meio de cultura sólido (LB com ampicilina) com X-gal, e incubadas a 37°C durante a noite. Após o crescimento, as colônias foram organizadas em placas contendo meio SOB sólido com ampicilina. Cada clone crescido foi transferido para placa específica de crescimento bacteriano com 96 poços, com o auxílio de um palito estéril para inocular em cada poço, e incubados a 37°C durante a noite. Após a incubação, foi adicionado glicerol 50% para armazenamento a -20°C.

A confirmação de que os plasmídeos possuíam insertos de diferentes tamanhos foi feita através de PCR com *primers* universais M13. Para seqüenciamento dos clones positivos, foi retirada 1 µl das células para a reação de PCR de colônia, numa reação com volume final de 12 µl, contendo: 1,25 µl de dNTPs (2,5 mM), 1,25 µl de tampão para PCR 10X (10mM de Tris-HCl, 50 mM KCl, pH=8,3), 1 µl de primer M13 Forward (2pmol/µl) ou de primer M13 Reverse (2pmol/µl), 0,2 µl de enzima Taq polimerase (5U/µl) e 1,5 µl de MgCl₂ (25 mM). Para a amplificação foi utilizado termociclador programado para 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 92°C por 1 min, 50°C por 40 s e 72°C por 1 min 30 s, e uma etapa final de 72°C por 5 min. Os produtos de PCR foram purificados com enzimas EXO (*exonuclease*) e SAP (*Shrimp Phosphatase Alcaline*), utilizando 0,17 µl de EXO e 0,33 µl de SAP para 3 µl de produto de PCR, em termociclador a 37°C por 30 min seguido de 80°C por 15 min. Para a reação de seqüenciamento foi utilizado 3,5 µl deste produto purificado, 2 µl de primer M13 (Forward ou Reverse) e 2 µl de Dye ET

Terminator (Amersham Bioscience), em uma reação de volume final de 9,5 µl, utilizando termociclador programado para 35 ciclos de 94°C por 20 s, 50°C por 15 s e 60°C por 1 min. O produto desta reação foi purificado pelo método de precipitação com acetato de amônia e etanol 70% e verificado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, na presença de um marcador de peso molecular conhecido. O seqüenciamento deste produto foi realizado em seqüenciador automático *MegaBaceTM 1000* (GE Healthcare, England).

Os fragmentos seqüenciados que possuíam microssatélites foram selecionados para desenho dos pares de *primers* na região flanqueadora, com auxílio do programa Primer 3 (Rozen & Skaletsky, 2000) disponível *on line* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), baseado em algumas características como quantidade e proporção de C/G, tamanho do fragmento, pareamento e formação de estruturas secundárias pelos iniciadores.

3.2.2. Caracterização dos *loci* microssatélites (SSR)

3.2.2.1. Teste de Polimorfismo

Aos *primers* desenhados foi adicionada uma seqüência M13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') à extremidade 5' do primer Forward, e a uma seqüência M13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') havia sido incorporada ao fluorocromo FAM, de acordo com o método econômico descrito por Schuelke (2000). O teste de polimorfismo e a PCR de genotipagem foram realizadas em um volume total de 10 µl, contendo 1 µl de tampão de PCR 10X (100 mM TrisHCl, 500 mM KCl, pH 8.4), 1 µl de dNTP (2,5 µM), 1 µl de MgCl₂ (25 mM),

0,25 µl de *primer Forward* M13 marcado com FAM ou HEX (5 µM), 0,5 µl *primer Reverse* M13, 0,2 µl de *Taq* DNA polimerase (Biotools), 1,8 µl de água Milli-Q, e 4 µl de DNA genômico (10 ng/µl). As amplificações foram realizadas em termociclador nas seguintes condições: 94° C por 2 min, seguido de 25 ciclos de 94° C por 10 s, a temperatura de anelamento do primer T_a por 20 s, 72° C por 30 s; extensão de 72° C por 10 min; 20 ciclos de 94° C por 10 s, 50° C por 20 s, 72° C por 30 s; e uma extensão de 72° C por 30 min. O produto de PCR foi diluído 5 vezes para utilizar 2 µl na genotipagem, contendo *Tween* 0,1% e padrão de genotipagem ET-400-ROX (GE Healthcare, England). Os produtos de PCR foram injetados em seqüenciador automático *MegaBaceTM 1000* (GE Healthcare, England) e analisados com auxílio dos Programas *Genetic Profiler* e *Fragment Profiler* (Amersham Biosciences), o qual gerou um relatório com os genótipos de cada indivíduo.

3.2.2.2. Caracterização genética dos *loci* microssatélites desenvolvidos

A eficiência do conjunto de *primers* desenvolvidos foi avaliada em 41 indivíduos da população do rio Uatumã (Amazonas) por meio de uma análise do Poder de Discriminação Calculado (D) e Estimado (D_L) de acordo com Tessier *et al.* (1999), a partir das freqüências alélicas dos genótipos analisados, sendo também determinados o número de alelos (A), e estimada a heterozigosidade esperada (H_E) e a heterozigosidade observada (H_o) com o programa Arlequin 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram seqüenciados 192 clones de fragmentos de DNA genômico de camu-camu. Destes, 80 continham seqüências de microssatélites, sendo os motivos mais comuns, GA e CT (Tabela 1), e na maioria classificados como perfeitos simples (Tabela 2), variando de 7 a 23 repetições, sendo 98,1 % dinucleotídeos e apenas 1,9 % trinucleotídeos.

Tabela 1. Frequência dos motivos de repetição de microssatélite encontrados em *Myrciaria dubia*.

| Motivo de repetição | Frequência |
|---------------------|------------|
| GA/CT | 61,1 % |
| AG/TC | 35,2 % |
| GGC/CCG | 1,9 % |
| AT/GC | 0,9 % |
| CA/TC | 0,9 % |

Tabela 2. Porcentagem dos microssatélites encontrados em *Myrciaria dubia* de acordo com o tipo de repetição.

| Tipo de repetição | Frequência |
|-----------------------|------------|
| Perfeito Simples | 84,8 % |
| Perfeito Interrompido | 11,4 % |
| Composto | 3,8 % |

Das seqüências contendo microssatélites, 36 (45%) apresentaram tamanho e posição de seqüência repetitiva adequados para o desenho dos *primers* na região flanqueadora, sendo 14 seqüências selecionadas para desenho de *primers*. Destes, 12 (85,7 %) tiveram sucesso na amplificação,

produzindo fragmentos do tamanho esperado, com 9 (75 %) demonstrando polimorfismo.

O número de alelos por *locus* variou de 3 a 10, com uma média de 6,89 alelos por *locus* (Tabela 3). Essa média foi superior à encontrada em outras espécies da família Myrtaceae considerando apenas os *loci* polimórficos, como *Melaleuca alternifolia*, que apresentou média de 4,2 tendo n=5 (Rossetto *et al.*, 1999), *Melaleuca cajuputi*, com 5,72 utilizando n=31 de populações naturais (Miwa *et al.*, 2000), *Psidium guajava*, com 4,5 tendo n=16 (Risterucci *et al.*, 2005) e *Metrosideros boninensis*, onde a média foi de 4,56 em n=110 indivíduos de populações naturais (Kaneko *et al.*, 2007).

A média do número de alelos por *locus* foi inferior à encontrada na mesma espécie em estudo, utilizando EST-SSRs em plantas do mesmo BAG analisado, onde a média em oito *loci* analisados foi de 12,75 (Rojas G. *et al.*, 2008); *Metrosideros polymorpha* apresentou média de 11,4 em n=23 de uma população natural (Crawford *et al.*, 2008); *Calothamnus quadrifidus* também apresentou valor superior, de 12,8 em um n=22 de população natural (Elliot & Byrne, 2005) e *Eugenia uniflora*, utilizando n=84 de população de fragmento florestal de áreas altamente impactadas por prática agrícola, teve média de 14,4 alelos por *locus* em sete microssatélites (Ferreira-Ramos *et al.*, 2008).

A heterozigosidade observada (H_o) variou de 0,211 a 0,897, apresentando uma média de 0,531. Foi inferior à encontrada em *M. cajuputi*, com valor de 0,61 (Miwa *et al.*, 2000), à de *C. quadrifidus*, que teve média de 0,664 (Elliot & Byrne, 2005) e à de *M. polymorpha*, com 0,665 (Crawford *et al.* 2008). A heterozigosidade observada apresentou-se superior à de *M.*

boninensis, cujo valor foi de 0,369 (Kaneko *et al.*, 2007) e por *P. guajava*, de 0,42 (Risterucci *et al.*, 2005).

A heterozigosidade esperada (H_e) variou de 0,39 a 0,832, com média de 0,679. Este valor é bastante próximo ao encontrado em *M. cajuputi* (Miwa *et al.*, 2000), na qual foi encontrada uma média de 0,66, sendo superior ao encontrado em *C. quadrifidus*, que teve média de 0,528 (Elliot & Byrne, 2005), e ao de *M. boninensis*, com 0,528 (Kaneko *et al.*, 2007). Utilizando EST-SSRs em camu-camu, Rojas G. *et al.* (2008) encontraram um valor maior para H_e , de 0,797, assim como em *M. polymorpha* que apresentou 0,724 (Crawford *et al.* 2008), e em *E. uniflora*, na qual a média de 0,83 foi também superior (Ferreira-Ramos, 2008).

Tabela 3. Características de nove *loci* microsatélites de *Myrciaria dubia* (população do Rio Uatumã, Amazonas, Brasil, $n = 41$): T_a , temperatura de anelamento do *primer* A; número de alelos por *locus*; D_L , poder discriminatório estimado; D , poder discriminatório calculado; H_o , heterozigosidade observada; H_e , heterozigosidade esperada.

| Nº | Locus | Motivo | T_a (°C) | Size range | A | D_L | D | H_o | H_e |
|----|----------|---------------------------------------|---------------|---------------|----|-------|------|-------|-------|
| 1 | Md01_G03 | (AG) ₆ GG(AG) ₇ | 56 | 229-245 | 9 | 0,77 | 0,82 | 0,310 | 0,641 |
| 2 | Md01_F04 | (CT) ₉ | 56 | 211-229 | 3 | 0,38 | 0,40 | 0,381 | 0,390 |
| 3 | Md01_F09 | (GA) ₁₂ | 56 | 171-185 | 8 | 0,83 | 0,88 | 0,897 | 0,780 |
| 4 | Md01_H01 | (GA) ₁₁ | 56 | 198-238 | 6 | 0,73 | 0,80 | 0,211 | 0,782 |
| 5 | Md01_B05 | (CT) ₁₁ | 56 | 195-235 | 10 | 0,85 | 0,93 | 0,621 | 0,832 |
| 6 | Md01_C03 | (AG) ₉ | 56 | 144-170 | 10 | 0,78 | 0,91 | 0,690 | 0,727 |
| 7 | Md01_C11 | (GA) ₁₀ | 56 | 178-184 | 3 | 0,54 | 0,60 | 0,556 | 0,569 |
| 8 | Md01_F02 | (AG) ₈ G(GA) ₄ | 56 | 186-192 | 5 | 0,75 | 0,89 | 0,586 | 0,661 |
| 9 | Md02_C02 | (AG) ₁₃ G(GA) ₇ | 56 | 194-206 | 8 | 0,82 | 0,90 | 0,523 | 0,731 |

Os valores de poder de discriminação estimado (D_L) foram maiores que 0,75 em seis *loci*, estando próximo a este valor em um *locus*. Os

valores de D foram superiores em sete *loci*, demonstrando alto conteúdo de informação e eficiência em detectar a variação genética.

Os microssatélites descritos neste estudo apresentaram altos níveis de diversidade genética, indicando que são extremamente úteis para análises de diversidade e estrutura genética em populações de camu-camu, possibilitando desta forma a avaliação da variabilidade genética e a organização do germoplasma.

3.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Billot, C.; Rousvoal, S.; Estoup, A. 1998. Isolation and characterization of microsatellite markers in the nuclear genome of the brown alga *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *Molecular Ecology*. 7: 1778-1780.
- Crawford, N.G.; Hagen, C.; Sahli, H.F.; Stacy, E.A.; Glenn, T.C. 2008. Fifteen polymorphic microsatellite DNA loci from Hawaii's *Metrosideros polymorpha* (Myrtaceae: Myrtales), a model species for ecology and evolution. *Molecular Ecology Resources*. 8: 308-310.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*. 19: 11-15.
- Edwards, K.J.; Barker, J.H.A.; Daly, A.; Jones, C.; Karp, A. 1996. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *Biotechniques*. 20: 758.
- Elliott, C. P.; Byrne, M. 2005. Isolation and characterization of microsatellites in the woody shrub, *Calothamnus quadrifidus* (Myrtaceae). *Molecular Ecology Notes*. 5: 757–759.
- Excoffier, L.G.L.; Schneider, S. 2005. Arlequin Ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 1: 47-50.
- Farias, I.P.; Hrbek, T.; Brinkmann, H.; Sampaio, I.; Meyer, A. 2003. Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. *Molecular Ecology Notes*. 3: 128-130.
- Ferreira-Ramos, R.; Laborda, P.R.; Santos, M.O.; Mayor, M.S.; Mestriner, M.A.; Souza, A.P.; Alzate-Marin, A.L. 2008. Genetic analysis of forest species *Eugenia uniflora* L. through of newly developed SSR markers. *Conservation Genetics*. 9(5): 1281-1285.
- Hughes, M.; Hollingsworth, P.M.; Squirrell, J. 2002. Isolation of polymorphic microsatellite markers for *Begonia sutherlandii* Hook. f. *Molecular Ecology Notes*. 2: 185-186.
- Kaneko, S.; Yuji Isagi, Y.; Nobushima, F. 2007. Development of microsatellite markers for *Metrosideros boninensis* (Myrtaceae), an endangered endemic plant species from the Bonin Islands, Japan. *Conserv Genet*. 8:753–755.

- Latouche-Hallé, C.; Ramboer, A.; Bandou, E.; Caron, H.; Decroocq, S. 2002. Isolation and characterization of microsatellite markers in the tropical tree species *Dicorynia guianensis* (Caesalpinaceae). *Molecular Ecology Notes*. 2: 288-230.
- Miwa, M.; Tanaka, R.; Shinone, M.; Kojima, K.; Hogetsu, T. 2000. Development of polymorphic microsatellite markers in a tropical tree species, *Melaleuca cajuputi* (Myrtaceae). *Molecular Ecology*. 9: 629-644.
- Oliveira, E. J.; Pádua, J. G.; Zucchi, M. I.; Vencovsky, R.; Vieira, M. L. C. V. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*. 29 (2): 294-307.
- Ouborg, N.J.; Goodall-Copestake, W.P.; Saumitou-Laprade, P.; Bonnin, I.; Epplen, J.T. 2000. Novel polymorphic microsatellite *loci* isolated from the yellow waterlily, *Nuphar lutea*. *Molecular Ecology*. 9: 497-498.
- Payn, K.G.; Dvorak, W.S.; Janse, B.J.H; Myburg, A.A. 2008. Microsatellite diversity and genetic structure of the commercially important tropical tree species *Eucalyptus urophylla*, endemic to seven islands in eastern Indonesia. *Tree Genomics & Genomes*. 4: 519-530.
- Risterucci, A.M.; Duval, M.F.; Rohde, W.; Billotte, N. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. *Molecular Ecology Notes*. 5(4): 745-748.
- Rojas G., S.; Rodrigues, D.; Lima, M.; Astolfi-Filho, S. 2008. Desenvolvimento e mapeamento de microssatélites gênicos (EST-SSRs) de camu-camu (*Myrciaria dubia* [H.B.K.] McVaugh). *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnologia Agropecuaria*. 9(1): 14-21.
- Rossetto, M., McLauchlan, A.; Harriss, F. C. L.; Henry, R. J.; Baverstock, P. R.; Lee, L. S.; Maguire, T. L.; Edwards, K. J. 1999. Abundance and polymorphism of microsatellite markers in the tea tree (*Melaleuca alternifolia*, Myrtaceae). *Theor Appl Genet*. 98: 1091-1098.
- Rozen, S. & Skaletsky, H.J. 2000. PRIMER3 on the WWW for general users and for biologists programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (Eds. Krawetz, S. & Misener, S.). Humana Press, Totowa, NJ, USA. pp. 365-386.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*. 18: 233-234.

- Soranzo, N.; Provan, J.; Powell, W. 1998. Characterization of microsatellite *loci* in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology*. 7: 1260-1261.
- Squirrell, J.; Hollingsworth, P. M.; Woodhead, M.; Russell, J.; Lowe, A. J.; Gibby, M.; Powell, W. 2003. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants?. *Molecular Ecology*. 12: 1339–1348.
- Steane, D. A.; Conod, N.; Jones, R.C.; Vaillancourt, R.E.; Potts, B.M. 2006. A comparative analysis of population structure of a forest tree, *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), using microsatellite markers and quantitative traits. *Tree Genetics and Genomes*. 2: 30-38.
- Tessier, T.; David, J.; This, P.; Boursiquot, J. M.; Charrier, A. 1999. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theoretical and Applied Genetics*. 98: 171-177
- Zane, L.; Bargelloni, L.; Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*. 11: 1-16.
- Zhou, Z.; Miwa, M.; Hogetsu, T. 1999. Analysis of genetic structure of a *Suillus grevillei* population in a *Larix keampferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). *New Phytologist*. 144: 55-63.

**ANÁLISE DE DIVERSIDADE
GENÉTICA EM ACESSOS DE
CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*
(H.B.K.) MCVAUGH) DO
BANCO DE GERMOPLASMA
DO INSTITUTO NACIONAL DE
PESQUISAS DA AMAZÔNIA -
INPA UTILIZANDO
MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

4 – ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) MCVAUGH) DO BANCO DE GERMOPLASMA DO INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES

RESUMO

O camu-camu é uma espécie frutífera nativa da região amazônica com teor de ácido ascórbico extremamente elevado, fator responsável pela sua grande aceitação no mercado externo. É uma espécie não domesticada que apresenta alta variabilidade fenotípica; para o programa de melhoramento genético, são etapas fundamentais e necessárias a caracterização molecular e a avaliação do germoplasma existente. O objetivo deste estudo foi analisar a diversidade genética intra e interpopulacional, avaliar as relações e a estrutura genética entre acessos de populações existentes no Banco Ativo de Germoplasma do INPA. Sete *loci* microssatélite foram utilizados para analisar 214 acessos de 17 populações. Foi detectado um total de 135 alelos, com média de 19,3 alelos por *locus*. As heterozigosidades observadas (H_o) foram inferiores às esperadas (H_e) em todos os *loci*, e os coeficientes de endogamia (f) foram relativamente altos, indicando um excesso de homozigotos. A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que 79,39% do total da variação genética foi encontrada dentro dos indivíduos e 20,61% entre as populações, demonstrando a existência de estruturação genética. A diferenciação genética entre populações foi considerada intermediária, com $F_{ST} = 0,3346$ e $R_{ST} = 0,32255$. A correlação entre distâncias genéticas e geográficas demonstrou que as populações não estão estruturadas no espaço. A variabilidade encontrada poderá ser aplicada a programas de melhoramento, auxiliando na escolha de cruzamentos e na organização do BAG.

Palavras-chave: *Myrciaria dubia*, microssatélite, estrutura genética, diversidade genética

GENETIC DIVERSITY ANALYSIS IN CAMU-CAMU (*MYRCIARIA DUBIA* (H.B.K.) MCVAUGH) ACCESSIONS FROM INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZONIA - INPA GERMPLASM COLLECTION USING MICROSATELLITE MARKERS

ABSTRACT

The camu-camu is a native Amazonian region fruit species which contains high score acid ascorbic, factor responsible for its wide acceptance in foreign markets. It is a non domesticated species with high fenotipic variability; for the improvement program it is needed and necessary the molecular characterization and germplasm evaluation. The aim of this study was to analyze the genetic diversity within and among populations, study the relations and the genetic structure among populations acessions from the INPA active germplasm collection. Seven microsatellite *loci* were used to analyze 214 acessions from 17 populations. A total of 135 alleles were detected, with a mean of 19.3 alleles per *locus*. The observed heterozygosities (H_o) were lower than expected (H_e) in all *loci*, and the inbreeding coefficients (f) were relatively high, suggesting an excess of homozygotes. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed that 79.39% of the total genetic variation was found within the individuals and 20.61% among populations, demonstrating the existence of genetic structuring. The genetic differentiation among populations was considered intermediate, with $F_{ST} = 0,3346$ and $R_{ST} = 0.32255$. The correlation between genetic and geographical distances showed that populations are not structured in space. The variability found can be applied to improvement programs, assisting in the choice of crossings and the organization of the BAG.

Palavras-chave: *Myrciaria dubia*, microsatellite, genetic structure, genetic diversity

4.1. INTRODUÇÃO

O camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) apresenta um grande potencial econômico nos diversos setores da indústria, como a farmacológica, a de cosméticos, a alimentícia, a de conservantes naturais e a de bebidas, tendo sua utilização já bem estabelecida nas indústrias do mercado consumidor internacional.

O camu-camu é uma das frutas amazônicas com maior aceitação nos mercados externos, devido ao seu alto teor de ácido ascórbico. É fato que o fruto é mais conhecido e, conseqüentemente, mais consumido em outros países do que pela própria população brasileira, onde existem pequenas indústrias nacionais que produzem produtos à base de camu-camu exclusivamente para exportação.

No Peru, entre os anos de 1998 e 1999, a exportação de camu-camu alcançou suas maiores cifras, com 150 e 250 toneladas, respectivamente, que foram exportadas principalmente para o Japão e os Estados Unidos. Nos últimos anos a exportação tem diminuído, tendo supostamente como principal causa, a falta de padronização no controle de qualidade do ácido ascórbico que os frutos coletados de populações naturais apresentam. Yuyama *et al.* (2002) encontraram que o teor de ácido ascórbico possui uma grande amplitude de variação entre frutos coletados em diferentes populações, observando também que, em algumas populações, houveram grandes desvios padrão entre os acessos coletados, devido a diferenças genéticas e diferentes graus de maturação dos frutos.

4.1. Introdução

Os estudos nesta espécie revelam que há muitas variantes morfológicas. No entanto, a análise de variabilidade morfológica como um método de avaliação da diversidade genética é diretamente influenciado por efeitos ambientais. As técnicas moleculares são uma opção que não está sujeita à variação ambiental.

Em um estudo na espécie utilizando-se isoenzimas, foram avaliados seis *loci*, sendo dois destes polimórficos. Foram analisadas três populações de camu-camu: Iquitos, Uatumã e Cauamé. O teste exato utilizando dados de distribuição de frequência alélica, e a distância genética, demonstraram que as populações de Iquitos e Cauamé são semelhantes entre si, e distintas da população de Uatumã (Teixeira *et al.*, 2004).

Rojas (2007), trabalhando com acessos de populações do mesmo BAG, encontrou dois grandes grupos baseado nas distâncias genéticas de Nei (1978): o primeiro, composto pelas plantas oriundas de Rondônia, Pará, Amazonas Oriental e fronteira entre Estado do Amazonas e Peru e o segundo, formado por acessos de Roraima e Amazonas Ocidental.

Apesar de já existir um mercado consumidor nacional, e principalmente, internacional, o camu-camu é uma planta ainda não-domesticada. A obtenção dos frutos é feita por extrativismo direto em populações naturais ou por cultivos em sistemas de pouca tecnologia aplicada, onde não é utilizado semente ou clone de material melhorado. As espécies não domesticadas representam um importante reservatório gênico para o melhoramento. Por isso se faz necessário um avanço no conhecimento e uso da variabilidade genética e seleção dos materiais com alta produtividade, rentabilidade e teor de ácido ascórbico. Para o camu-camu, que apresenta alta variabilidade fenotípica, a

4.1. Introdução

caracterização molecular e a avaliação do germoplasma existente são etapas fundamentais e necessárias para o estabelecimento do programa de melhoramento genético.

O objetivo do presente estudo foi analisar a diversidade genética intra e interpopulacional, avaliar as relações genéticas a partir de uma matriz de distância genética, estimar o fluxo gênico e a estrutura genética de 17 populações de *Myrciaria dubia* provenientes de diferentes localidades utilizando marcadores microssatélites.

4.2.1. Coleta de material genético e extração de DNA

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Coleta de material genético e extração de DNA

Foram utilizados acessos do Banco Ativo de Germoplasma de camu-camu do INPA, provenientes de 17 localidades da região amazônica (Yuyama *et al.*, 2002b), totalizando 214 amostras. As plantas são provenientes dos rios: Cauamé (RR), Urubu (RR), Trombetas (PA), Urupá (RO), Machado (RO), Madeira (RO), Jamari (RO), Jaru (RO), Candeias (RO), Rio Tocantins, na cidade de Marabá (PA), Uatumã (AM), Tarumã (AM), Javari (AM – fronteira com Peru), Aracá (AM) e cidade de Iquitos no Peru, e das Ilhas Pirarucu e Pirarara, próximo à cidade de Barcelos no Rio Negro (AM) (Figura 1).

O DNA foi extraído a partir de 100 mg de folhas, sendo estas maceradas na presença de nitrogênio líquido e foi então seguido o método CTAB 2% descrito por Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987) com modificações.



Figura 1. Localização dos pontos de coleta de acessos de camu-camu.

4.2.2. Amplificação dos *loci* microssatélites

Aos sete pares de *primers* mais informativos (desenvolvimento citado no Capítulo 2) foi adicionada uma seqüência M13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') à extremidade 5' do *primer Forward*, e a uma seqüência M13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') foi incorporada a um fluorocromo (FAM, HEX), de acordo com o protocolo descrito por Schuelke (2000).

A PCR foi realizada com um volume total de 10 µl, contendo 1 µl de tampão de PCR 10X (100 mM TrisHCl, 500 mM KCl, pH 8.4), 1 µl de dNTP (2,5 µM), 1 µl de MgCl₂ (25 mM), 0,25 µl de *primer Forward* M13 (2,5 µM), 0,25 µl *primer* M13 marcado com FAM (2,5 µM), 0,5 µl de *primer Reverse* (2,5 µM), 0,2 µl de Taq DNA polimerase (a 5U/ µl, Biotools), 1,8 µl de água Milli-Q, e 4 µl de DNA genômico (a 10 ng/µl). As amplificações foram realizadas em termociclador nas seguintes condições: 94° C por 2 min, seguido de 25 ciclos de 94° C por 10 s, a temperatura de anelamento do *primer* T_a por 20 s, 72° C por 30 s; extensão de 72° C por 10 min; 20 ciclos de 94° C por 10 s, 50° C por 20 s, 72° C por 30 s; e uma extensão de 72° C por 30 min.

Os produtos de PCR gerados foram injetados com marcador de peso molecular *ET-400* (GE Healthcare, England) em seqüenciador automático *MegaBaceTM 1000* (GE Healthcare) e analisados com auxílio dos Programas *Genetic Profiler* e *Fragment Profiler* (Amersham Biosciences), o qual gerou um relatório com os genótipos de cada indivíduo.

4.2.3. Análise Genética

As populações foram caracterizadas a partir das freqüências alélicas, dos índices de diversidade genética intrapopulacionais e da distância genética.

O número de alelos, alelos privados e as freqüências alélicas por *locus* e por população foram calculados pelo programa Convert (Glaubitz, 2004). A partir das freqüências alélicas, os alelos foram classificados em comuns quando apresentaram freqüências superiores a 20%, em intermediários quando ocorreram com freqüências entre 5% e 20%, e em raros os que tiveram freqüências inferiores a 5%. Em relação à distribuição nas populações, os alelos que existem em apenas uma população foram classificados em privados, os que estão presentes entre duas a seis populações, em esporádicos, e os que surgem em sete ou mais populações, em difundidos (Marshall & Brown, 1975).

O Teste Exato (Raymond & Rosset, 1995) foi utilizado para determinar a existência de diferenças significativas nas freqüências alélicas entre os acessos e populações, tanto para cada *locus* como para o conjunto de *loci*, calculados por meio do Programa TFGA (Miller, 1997).

Para determinação da estrutura genética entre e dentro das populações foi realizada uma análise hierárquica da variância molecular (AMOVA, Michalakis & Excoffier, 1996), utilizando o programa Arlequin v.3.01 (Excoffier *et al.*, 2005).

A diversidade genética intrapopulacional foi caracterizada pela porcentagem de *loci* polimórficos, pelo número médio de alelos por *locus*, pela heterozigosidade observada, pela heterozigosidade esperada em equilíbrio de

4.2.3. Análise genética

Hardy-Weinberg e pelo índice de fixação, utilizando o programa Arlequin v.3.01 (Excoffier *et al.*, 2005) para cálculo destes valores. O parâmetros H_T e G_{ST} foram calculados pelo programa Genetix versão 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2000). A estatística R_{ST} foi estimada por assumir o modelo de mutação 'stepwise' (Slatkin, 1995), uma vez que as estatísticas-F de Wright (utilizando o programa Rst CALC v.2.2 (Goodman, 1997), após padronização dos tamanhos dos alelos pelo programa Rst Standardize v. 2.2 (Goodman, 1997), e sua significância foi testada por meio de permutação (10.000) e *bootstrap* para todos os *loci*, com intervalo de confiança de 95%. F_{ST} calcula o nível de estruturação genética da população pela quantificação da proporção de variação total que ocorre entre populações.

O fluxo gênico médio foi estimado considerando que $Nm = (1/F_{ST} - 1)/4$ (Whitlock & MacCauley, 1999), tendo o número absoluto de migrantes ($M = 2Nm$) baseado em F_{ST} , usando o programa Arlequin v.3.01 (Excoffier *et al.*, 2005).

A divergência genética entre pares de populações foi avaliada pela distância genética de Rogers (1972) modificada (Wright, 1978), calculada pelo programa TFPGA (Miller, 1997). A medida de distância genética de Rogers (1972) modificada (Wright, 1978) foi então utilizada para o agrupamento das populações e para a construção de dendogramas pelo método de agrupamento de médias não ponderadas UPGMA (Unweighted Pair Group Method), também utilizando o Programa TFPGA (Miller, 1997). A estabilidade dos agrupamentos dentro do dendograma foi testada por procedimentos de reamostragem, utilizando 10.000 *bootstraps*.

4.2.3. Análise genética

Para analisar os padrões de variação espacial, foi obtida uma estimativa do coeficiente de correlação de Pearson (r) entre matrizes de distâncias genéticas de Rogers (1972) modificadas (Wright, 1978) e de distâncias geográficas entre as populações. A significância desta correlação matricial foi testada pela estatística Z de Mantel utilizando 10.000 permutações aleatórias pelo programa TFPGA (Miller, 1997).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Diversidade alélica dos *loci* microssatélites em camu-camu

Os sete *loci* microssatélites testados revelaram 135 alelos nas 17 localidades, com uma média de 19,3 alelos por *locus*, o que evidencia que estes marcadores desenvolvidos possuem alto conteúdo de informação genética, sendo bastante adequados para análises genéticas em camu-camu. O número de alelos por *locus* variou de 16 em 02_C02 a 23 em 01_B05 (Tabela 1). Rojas Gonzalez *et al.* (2008), analisando a mesma espécie utilizando oito *loci* EST-SSRs em 139 acessos, encontraram uma média de 12,75 alelos por *locus*, inferior à detectada neste estudo; o número total de alelos também foi menor, variando de sete a 21.

Esta média obtida foi semelhante à encontrada em *Eucalyptus globulus*, que obteve 19,4 alelos por *locus* utilizando oito *loci* microssatélites em dez populações (Steane *et al.*, 2006), e à *E. grandis*, com média de 19,8 alelos encontrados em seis *loci* de 193 indivíduos (Kirst *et al.*, 2005). A média encontrada foi superior à de outras espécies de Myrtaceae, como *E. urophylla*, com 10,1 alelos em 12 *loci* aplicados a 19 populações (Payn *et al.*, 2008) e *Eugenia uniflora*, com 14,4 alelos em sete *loci* analisados em três populações (Ferreira-Ramos *et al.*, 2008).

4.3.1. Diversidade alélica dos *loci* microssatélites em camu-camu

Tabela 1. Índices de diversidade genética a partir de sete *loci* microssatélites em 214 acessos de *Myrciaria dubia*.

| <i>Locus</i> | <i>A</i> | H_e | H_o | <i>f</i> | F_{IT} | F_{ST} | H_t | G_{st} |
|--------------|----------|--------|--------|----------|----------|----------|--------|----------|
| 01_B05 | 23 | 0.9255 | 0.4381 | 0.3057 | 0.5322 | 0.3263 | 0.9184 | 0.3309 |
| 01_C03 | 19 | 0.8438 | 0.3585 | 0.3544 | 0.6428 | 0.4467 | 0.8005 | 0.4277 |
| 01_F02 | 17 | 0.8700 | 0.5288 | 0.2003 | 0.4522 | 0.3149 | 0.8634 | 0.3209 |
| 01_F09 | 21 | 0.8959 | 0.6952 | 0.1405 | 0.3399 | 0.2320 | 0.8479 | 0.2412 |
| 01_G03 | 17 | 0.8492 | 0.3143 | 0.3334 | 0.5349 | 0.3022 | 0.8641 | 0.3116 |
| 01_H01 | 22 | 0.9182 | 0.5874 | 0.1316 | 0.4103 | 0.3210 | 0.9273 | 0.3345 |
| 02_C02 | 16 | 0.8432 | 0.4953 | 0.2618 | 0.4662 | 0.2769 | 0.8173 | 0.2829 |
| Media | 19,3 | 0.8780 | 0.4882 | 0.2408 | 0.4811 | 0.3166 | 0.8627 | 0.3214 |

O número de alelos privados totais foi de 43 (Tabela 2), distribuídos em dez das 17 populações, sendo que as plantas das localidades de Iquitos, Urubu e Uatumã são as que apresentaram maior número de alelos privados, respectivamente dez, dez e seis (Figura 2). Uma hipótese para um maior número de alelos privados nas plantas de Iquitos e Urubu é que tenha sido causado por deriva genética. O Anexo 1 mostra as freqüências alélicas dos sete *loci* nos 214 acessos, enquanto o Anexo 2, as freqüências dos alelos privados em cada população.

Tabela 2. Classificação dos alelos encontrados em acessos de 17 localidades do BAG camu-camu (*Myrciaria dubia*), de acordo com sua freqüência e distribuição em sete *loci* microssatélites.

| | Comum | Intermediário | Raro | Total |
|------------|-------|---------------|------|-------|
| Privado | 0 | 0 | 43 | 43 |
| Esporádico | 0 | 22 | 39 | 61 |
| Difundido | 7 | 24 | 0 | 31 |
| Total | 7 | 46 | 82 | 135 |

4.3.1. Diversidade alélica dos *loci* microssatélites em camu-camu

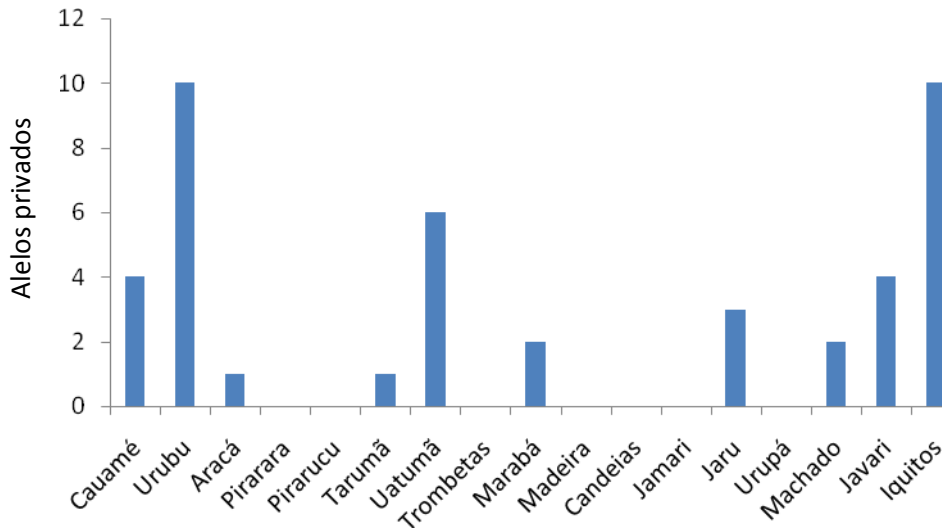


Figura 2. Número de alelos privados para as 17 populações analisadas de *Myrciaria dubia*.

Os valores de heterozigosidade observada (H_o) foram inferiores à heterozigosidade esperada (H_e) em todos os *loci*, indicando um excesso de homozigotos, o que concorda com os dados de Rojas Gonzalez (2007). Os coeficientes de endogamia (f) foram relativamente altos, variando de 0.1316 no *locus* 01_H01 a 0.3544 no *locus* 01_C03 (Tabela 2) e significativamente diferentes de zero ($p < 0,001$), também indicando déficit de heterozigotos. Uma alta taxa de endogamia pode existir devido a desvios de panmixia, e/ou deriva genética, pela fragmentação da população original, ou efeito do fundador (efeito gargalo), neste caso, possivelmente decorrente do baixo número amostral coletado em algumas localidades. Outra possibilidade a ser considerada é a de que, devido às altas taxas de mutação que ocorrem em microssatélites, os valores do coeficiente de endogamia podem estar

4.3.1. Diversidade alélica dos *loci* microssatélites em camu-camu

superestimados por existência de homoplasia, onde os alelos são idênticos por estado, mas não por descendência (Slatkin, 1995).

As estimativas de diversidade total (H_T) foram altas em todos os *loci* (Tabela 2), variando de 0.8005 em 01_C03 a 0.9273 em 01_H01, enquanto o F_{IT} obteve valores de 0.3399 em 01_F09 a 0.6428 em 01_C03. As estimativas de diferenciação genética entre populações G_{ST} , apesar de serem na maioria mais elevadas, apresentaram um comportamento semelhante ao F_{ST} , tendo o *locus* 01_C03 os maiores valores.

4.3.2. Diversidade genética inter e intrapopulacional

4.3.2. Diversidade genética inter e intrapopulacional

O conhecimento da variação genética entre e dentro de populações é fundamental para a adoção de estratégias efetivas para a conservação do germoplasma da espécie. A análise de variância molecular (AMOVA – Weir, 1996) mostrou que 79,39% do total da variação genética foi encontrada dentro dos indivíduos e 20,61% entre as populações, com valores significativos ($p < 0,001$).

Tabela 3. Estimativas das estatísticas F de Wright, de R_{ST} e do número de migrantes por geração (N_m) em 17 populações de *Myrciaria dubia* do BAG. Intervalo de confiança (IC) de 95% de probabilidade.

| | F_{ST} | F_{IS} | F_{IT} | R_{ST} | N_m |
|--------------------------|----------|----------|----------|----------|---------|
| Estimativa | 0,33463 | 0,27914 | 0,52036 | 0.32255 | 0.52506 |
| Limite superior (IC 95%) | - | - | - | 0.4410 | 0.5430 |
| Limite inferior (IC 95%) | - | - | - | 0.3152 | 0.3168 |

O índice de fixação para o conjunto das populações (F_{IT}) foi 0,5204 (Tabela 3), assim, existe uma probabilidade de 52,04% de que os alelos de um indivíduo do BAG sejam idênticos ao de outro indivíduo. O índice de fixação intrapopulacional (F_{IS}) foi 0,2791, o que significa que 27,9% dos cruzamentos ocorrendo dentro das populações são endogâmicos. Sendo esta uma medida de endogamia localizada devido ao sistema reprodutivo, indica a existência de possíveis cruzamentos entre indivíduos aparentados ou a ocorrência de autofecundação (autogamia), sendo que este fenômeno foi encontrado por Peters & Vásquez (1986; 1987; 1988), Cruz & Resende (2008) e Bacelar-Lima (Com. Pessoal) analisando o sistema reprodutivo de camu-camu; Maués & Couturier (2002) verificaram que há sobreposição temporal das fases sexuais

4.3.2. Diversidade genética inter e intrapopulacional

nas flores, o que facilita e propicia a ocorrência de autopolinização. Os marcadores EST-SSRs na mesma espécie demonstraram um valor de F_{IT} muito próximo, 0,502, enquanto que o F_{IS} apresentou um valor superior, de 0,377 (Rojas Gonzalez, 2007).

A diferenciação genética entre populações, relacionada com a variação genética total, foi considerada intermediária, com $F_{ST} = 0,3346$ e $R_{ST} = 0,32255$ (Tabela 3), sendo semelhantes entre si e significativamente diferentes de zero. A estimativa F_{ST} é um método indireto para se calcular o fluxo gênico, assumindo a estrutura genética populacional sob o modelo de ilhas de Wright (1951) e a existência de equilíbrio entre migração e deriva genética. Segundo Govindajaru (1989) o fluxo gênico pode ser dividido em três níveis: quando $Nm > 1$ é considerado alto, intermediário quando $0,25 < Nm < 0,99$ e baixo quando $Nm < 0,25$. O valor encontrado de Nm foi de 0,525 (Tabela 3), indicando uma taxa intermediária de migrantes entre as populações. Apesar de se saber que seus frutos fazem parte da alimentação de peixes e considerar que a espécie também é hidrocórica, não há conhecimento efetivo sobre o sistema de dispersão de sementes; desta forma, torna-se inviável inferir sobre a participação que os gametas, propágulos ou indivíduos que trocam genes possuem no fluxo gênico.

4.3.2. Diversidade genética inter e intrapopulacional

Tabela 4. Estimativas dos parâmetros genéticos baseados em sete *loci* de microssatélites para 17 populações de *Myrciaria dubia* do BAG: número de acessos analisados por população (N), número total de alelos (A_t), número médio de alelos por acesso (A_i), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o) e índice de fixação (f).

| Localidades | N | A_t | A_i | H_e | H_o | f |
|-------------|-----|-------|-------|---------|---------|---------|
| Cauamé | 13 | 47 | 3,62 | 0.80044 | 0.63736 | 0.2037 |
| Pirarara | 6 | 21 | 3,5 | 0.62626 | 0.80556 | -0.2863 |
| Javari | 5 | 25 | 5 | 0.75185 | 0.40000 | 0.4679 |
| Jamari | 5 | 13 | 2,6 | 0.47873 | 0.56000 | 0.1697 |
| Machado | 7 | 21 | 3 | 0.63292 | 0.56463 | 0.1078 |
| Urubu | 39 | 63 | 1,63 | 0.73784 | 0.47224 | 0.3599 |
| IQUITOS | 30 | 49 | 1,65 | 0.69280 | 0.57182 | 0.1746 |
| Madeira | 2 | 12 | 6 | 0.66667 | 0.00000 | 0 |
| Marabá | 6 | 25 | 4,2 | 0.66605 | 0.66667 | 0.0009 |
| Aracá | 6 | 19 | 3,2 | 0.61487 | 0.25000 | 0.5934 |
| Jaru | 8 | 21 | 2,72 | 0.62002 | 0.15476 | 0.7503 |
| Candeias | 25 | 41 | 1,6 | 0.65428 | 0.34857 | 0.4672 |
| Tarumã | 7 | 31 | 4,4 | 0.73438 | 0.49320 | 0.3284 |
| Pirarucu | 4 | 21 | 5,25 | 0.69388 | 0.75000 | 0.0808 |
| Trombetas | 5 | 16 | 3,2 | 0.59184 | 0.51429 | 0.1310 |
| Urupá | 5 | 21 | 4,2 | 0.64875 | 0.18571 | 0.7137 |
| Uatumã | 41 | 74 | 1,8 | 0.69735 | 0.65517 | 0.0604 |

O número total de alelos variou de 12 em Madeira a 74 em Uatumã, podendo esta quantidade ser reflexo do número amostral utilizado, uma vez que estas duas populações possuem respectivamente o menor e o maior número de acessos analisados.

As populações de Javari, Pirarucu e Madeira obtiveram os maiores números de alelos por acesso, respectivamente 5, 5,2 e 6. As populações que têm as maiores quantidades de acessos foram as que apresentaram o menor número de alelos por acesso, sendo Candeias ($A_i = 1,6$), Urubu ($A_i = 1,63$),

4.3.2. Diversidade genética inter e intrapopulacional

IQUITOS ($A_i = 1,65$) e UATUMÃ ($A_i = 1,8$). ROJAS GONZALEZ (2007) também encontrou em Uatumã e Candeias os menores valores de alelos por acesso.

A heterozigosidade esperada foi menor em Jamari ($H_e = 0.47873$) e maior em Cauamé ($H_e = 0.80044$), enquanto que a heterozigosidade observada variou de 0 em Madeira a 0.80556 em Pirarara. Os acessos de Pirarara foram diferenciados, apresentando o maior nível de heterozigosidade observada ($H_o = 0.80556$), sendo, juntamente com Pirarucu e Jamari, as únicas populações a terem heterozigosidade observada superior à esperada; tiveram também o menor coeficiente de endogamia ($f = -0.2863$).

De modo geral o fluxo gênico entre as populações foi intermediário, concordando com os níveis de médios a altos de F_{ST} (Tabela 5).

Tabela 5. Fluxo gênico [M (número absoluto de migrantes) = $2Nm$ – diagonal abaixo] e matriz de divergência (F_{ST} – diagonal acima) entre 17 populações de *Myrciaria dubia* do BAG, a partir de sete *loci* microssatélites.

| População | Cauamé | Pirarara | Javari | Jamari | Machado | Urubu | IQUITOS | Madeira | Marabó | Aracó | Jaru | Candeias | Tarumã | Pirarucu | Trombetas | Urupó | Uatumã |
|-----------|---------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|---------|---------|---------|----------|---------|----------|-----------|---------|---------|
| Cauamé | ***** | 0,18679 | 1,1451 | 0,29116 | 0,45621 | 0,23988 | 0,39211 | 1,42379 | 0,35882 | 0,19803 | 1,81793 | 0,7318 | 0,19092 | 0,15624 | 0,52154 | 0,37496 | 0,31459 |
| Pirarara | 2,67674 | ***** | 1,28212 | 0,87749 | 0,49934 | 0,2513 | 0,47141 | 0,74912 | 0,64665 | 0,39958 | 3,36271 | 0,30697 | 0,29297 | 0 | 0,5261 | 0,37101 | 0,151 |
| Javari | 0,43664 | 0,38998 | ***** | 0,74764 | 0,60964 | 0,3704 | 0,25008 | 2,46102 | 1,18662 | 0,4798 | 0,78526 | 1,80888 | 1,3518 | 0,8615 | 0,98093 | 0,72209 | 0,5491 |
| Jamari | 1,71725 | 0,56981 | 0,66877 | ***** | 0,09329 | 0,36186 | 0,34373 | 2,14765 | 0,52378 | 0,09321 | 0,80362 | 1,24447 | 0,55977 | 0,59698 | 1,00494 | 0,24594 | 0,44586 |
| Machado | 1,09598 | 1,00132 | 0,82016 | 5,35935 | ***** | 0,46838 | 0,40259 | 0,63813 | 0,41069 | 0,14326 | 0,86969 | 0,86652 | 0,33588 | 0,33847 | 0,40056 | 0 | 0,51116 |
| Urubu | 2,08435 | 1,98969 | 1,3499 | 1,38176 | 1,06751 | ***** | 0,12003 | 0,60178 | 0,21346 | 0,08615 | 0,73261 | 0,69668 | 0,12916 | 0,21669 | 0 | 0,40082 | 0,22433 |
| IQUITOS | 1,27515 | 1,06065 | 1,9994 | 1,45463 | 1,24196 | 4,16568 | ***** | 0,92469 | 0,38813 | 0,18641 | 0,49171 | 1,10921 | 0,42387 | 0,36633 | 0,08675 | 0,47301 | 0,53683 |
| Madeira | 0,35117 | 0,66745 | 0,20317 | 0,23281 | 0,78354 | 0,83087 | 0,54072 | ***** | 1,01034 | 0,94821 | 6,26792 | 0,02519 | 0,97903 | 0,66826 | 1,85992 | 1,19979 | 0,52177 |
| Marabó | 1,39347 | 0,77321 | 0,42137 | 0,9546 | 1,21747 | 2,34237 | 1,28823 | 0,49488 | ***** | 0,36131 | 1,67714 | 0,78867 | 0,26753 | 0,35212 | 0,82965 | 0,85636 | 0,41993 |
| Aracó | 2,52484 | 1,25132 | 1,04211 | 5,36428 | 3,49018 | 5,80394 | 2,68229 | 0,52731 | 1,38386 | ***** | 0,68201 | 0,65307 | 0,13242 | 0,33253 | 0,20714 | 0,1198 | 0,09257 |
| Jaru | 0,27504 | 0,14869 | 0,63673 | 0,62218 | 0,57492 | 0,68249 | 1,01686 | 0,07977 | 0,29813 | 0,73313 | ***** | 3,21901 | 2,24466 | 2,62136 | 3,05814 | 2,1267 | 1,22714 |
| Candeias | 0,63955 | 1,62882 | 0,27641 | 0,40178 | 0,57702 | 0,71769 | 0,45118 | 19,84652 | 0,63398 | 0,76562 | 0,15533 | ***** | 0,53975 | 0,35417 | 0,55637 | 0,64786 | 0,39888 |
| Tarumã | 2,61891 | 1,70666 | 0,36988 | 0,89322 | 1,48865 | 3,59302 | 1,15242 | 0,51071 | 1,86893 | 3,77597 | 0,22275 | 0,92636 | ***** | 0,32637 | 0,36991 | 0,54081 | 0,12308 |
| Pirarucu | 3,20025 | inf | 0,58038 | 0,83755 | 1,47722 | 2,30741 | 1,36489 | 0,74821 | 1,41996 | 1,50362 | 0,19074 | 1,41175 | 1,52199 | ***** | 0,42356 | 0,32544 | 0,14086 |
| Trombetas | 0,9587 | 0,9504 | 0,50972 | 0,49754 | 1,24825 | inf | 5,76359 | 0,26883 | 0,60266 | 2,41384 | 0,1635 | 0,89869 | 1,35168 | 1,18047 | ***** | 0,71135 | 0,02101 |
| Urupó | 1,33346 | 1,34768 | 0,69243 | 2,03305 | inf | 1,24745 | 1,05707 | 0,41674 | 0,58387 | 4,17355 | 0,23511 | 0,77177 | 0,92455 | 1,5364 | 0,70289 | ***** | 0,22925 |
| Uatumã | 1,58938 | 3,31129 | 0,91057 | 1,12144 | 0,97817 | 2,22885 | 0,93139 | 0,95827 | 1,19066 | 5,40125 | 0,40745 | 1,25352 | 4,06237 | 3,54965 | 16,12213 | 2,18104 | ***** |

4.3.3. Distâncias genéticas

4.3.3. Distâncias genéticas

As distâncias genéticas de Rogers (1972) modificadas (Wright, 1978), apresentadas na Tabela 6, variaram de um mínimo de 0,3243 (entre os acessos de Pirarara e Pirarucu) a um máximo de 0,7445 (entre os acessos de Jamari e Madeira).

Tabela 6. Distâncias genéticas de Rogers (1972) modificadas (Wright, 1978) entre 17 populações de *Myrciaria dubia* do BAG, a partir de sete *loci* microssatélites.

| População | Cauasú | Pirarara | Javari | Jamari | Machado | Urubu | Iquitos | Madeira | Marabá | Aracá | Jaru | Candeias | Tarumá | Pirarucu | Trombetas | Urupá | Uatumá |
|-----------|--------|----------|--------|--------|---------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|----------|--------|----------|-----------|--------|--------|
| Cauasú | ***** | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pirarara | 0,3811 | ***** | | | | | | | | | | | | | | | |
| Javari | 0,4944 | 0,6471 | ***** | | | | | | | | | | | | | | |
| Jamari | 0,4391 | 0,5198 | 0,7151 | ***** | | | | | | | | | | | | | |
| Machado | 0,4457 | 0,5264 | 0,6223 | 0,5733 | ***** | | | | | | | | | | | | |
| Urubu | 0,3615 | 0,5025 | 0,468 | 0,6253 | 0,5424 | ***** | | | | | | | | | | | |
| Iquitos | 0,4618 | 0,595 | 0,5744 | 0,6609 | 0,5642 | 0,4425 | ***** | | | | | | | | | | |
| Madeira | 0,5928 | 0,6799 | 0,6568 | 0,7445 | 0,5964 | 0,6097 | 0,6737 | ***** | | | | | | | | | |
| Marabá | 0,4725 | 0,6315 | 0,591 | 0,6561 | 0,5542 | 0,514 | 0,553 | 0,6637 | ***** | | | | | | | | |
| Aracá | 0,4587 | 0,5183 | 0,6317 | 0,5111 | 0,4072 | 0,524 | 0,5749 | 0,6122 | 0,561 | ***** | | | | | | | |
| Jaru | 0,4551 | 0,5247 | 0,593 | 0,4719 | 0,4377 | 0,5244 | 0,5374 | 0,6201 | 0,5798 | 0,4368 | ***** | | | | | | |
| Candeias | 0,4008 | 0,5134 | 0,5409 | 0,6095 | 0,5287 | 0,3744 | 0,5273 | 0,5793 | 0,5346 | 0,5183 | 0,465 | ***** | | | | | |
| Tarumá | 0,4214 | 0,5391 | 0,5572 | 0,6153 | 0,528 | 0,4666 | 0,4989 | 0,6558 | 0,5121 | 0,4671 | 0,4897 | 0,5086 | ***** | | | | |
| Pirarucu | 0,3795 | 0,3243 | 0,5757 | 0,513 | 0,5046 | 0,4409 | 0,5148 | 0,6339 | 0,555 | 0,5027 | 0,4587 | 0,42 | 0,5115 | ***** | | | |
| Trombetas | 0,5053 | 0,6304 | 0,6112 | 0,6949 | 0,5873 | 0,531 | 0,5428 | 0,6735 | 0,5345 | 0,5823 | 0,5678 | 0,5282 | 0,4509 | 0,5261 | ***** | | |
| Urupá | 0,437 | 0,519 | 0,6087 | 0,5163 | 0,5132 | 0,4918 | 0,5791 | 0,6455 | 0,5916 | 0,5512 | 0,4215 | 0,4842 | 0,5146 | 0,4659 | 0,604 | ***** | |
| Uatumá | 0,3588 | 0,5054 | 0,487 | 0,5859 | 0,492 | 0,3878 | 0,4399 | 0,6147 | 0,4382 | 0,4496 | 0,46 | 0,418 | 0,3363 | 0,429 | 0,464 | 0,4523 | ***** |

4.3.3. Distâncias genéticas

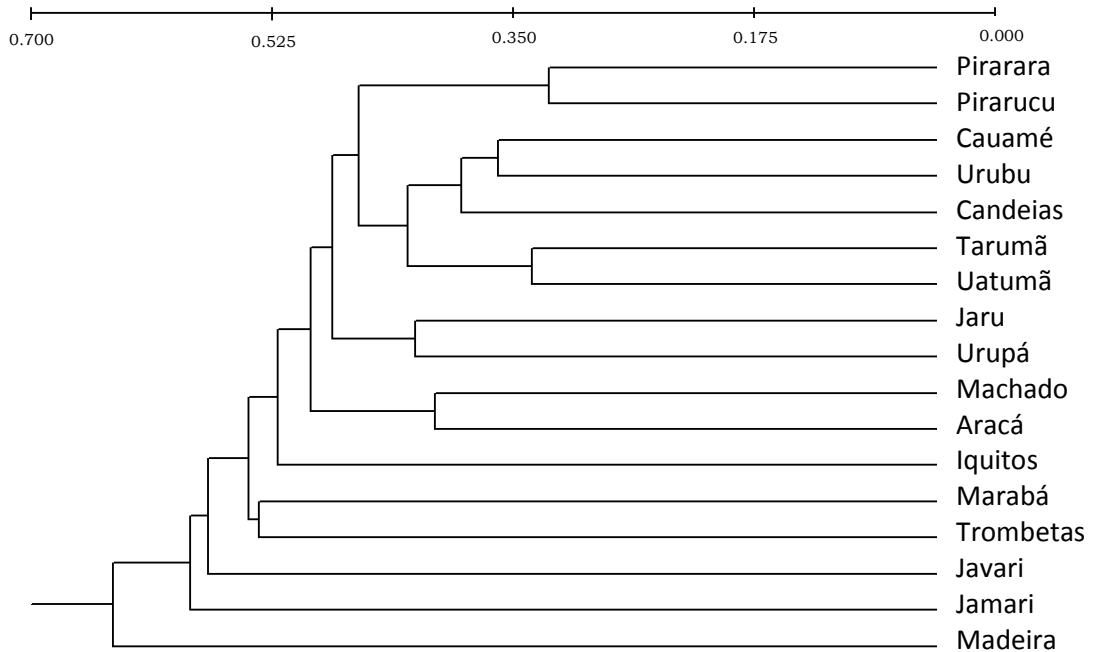


Figura 3. Padrão de divergência genética entre as 17 populações de *Myrciaria dubia* do BAG, baseado no agrupamento UPGMA utilizando as distâncias genéticas de Rogers (1972) modificadas (Wright, 1978). Dados provenientes de sete *loci* microsatélites.

A diferenciação entre populações e uma certa relação com as regiões geográficas pode ser observada no agrupamento pelo método UPGMA baseado nas distâncias genéticas de Rogers (1972) modificadas (Wright, 1978). As populações de Pirarara e Pirarucu agruparam-se, assim como as de Urubu e Cauamé, e Tarumã com Uatumã, sendo que estes três agrupamentos formam um único grupo juntamente com Candeias. Jaru e Urupá estão relacionados em um agrupamento separado, assim como Machado e Aracá em outro.

Verificou-se que a maioria das populações, principalmente as provenientes de Rondônia, agrupou-se aleatoriamente, e não de acordo com as áreas geográficas de origem. A hipótese previamente formulada de que as

4.3.3. Distâncias genéticas

populações geograficamente mais distantes também apresentariam maiores distâncias genéticas foi descartada pelos resultados de análise de correlação, que demonstraram não existir relação entre estes parâmetros.

Pode-se supor que algumas inconsistências encontradas podem ser devido ao baixo número amostral para algumas populações ou resultantes de equívocos durante a coleta ou mesmo na identificação individual das plantas no BAG. A ausência de relação é confirmada pela análise de correlação entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas pelo Teste de Mantel (Figura 4). A correlação matricial foi baixa e negativa ($r=0,233$), indicando que a variabilidade genética não está estruturada no espaço. Os EST-SSRs em camu-camu, considerando as distâncias genéticas de Nei (1978), encontraram uma correlação de 0,33 (Rojas Gonzalez, 2007).

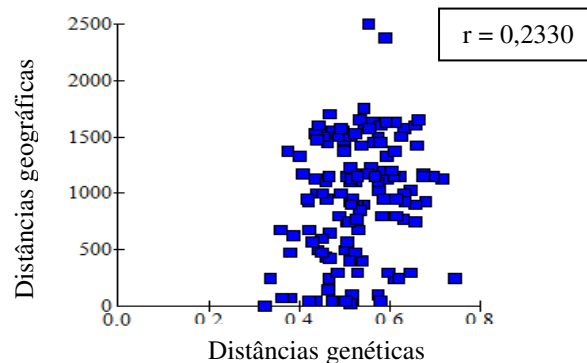


Figura 4. Representação da correlação entre a matriz de distâncias geográficas e a matriz de distâncias genéticas

4.3.3. Distâncias genéticas

Os resultados sugerem que a proximidade geográfica entre as populações de origem é um indicativo fraco de similaridade genética, portanto não serve como base para inferências quanto à estrutura genética para os acessos mantidos no BAG. A inexistência de relação significativa entre distâncias genéticas e distâncias geográficas também foi encontrada para populações brasileiras de *Oryza glumaepatula* (Karasawa, 2005) e populações de *Eucalyptus urophylla* distribuídas por ilhas da Indonésia (Payn *et al.*, 2008).

4.4. CONCLUSÃO

Os microssatélites desenvolvidos para camu-camu demonstraram ser suficientemente informativos, sendo semelhantes ou mesmo superiores em relação aos *loci* isolados para outras espécies de Myrtaceae.

Considerando apenas que o camu-camu é uma espécie não-domesticada, poderia-se supor um nível de polimorfismo ainda mais elevado; ainda assim, os resultados encontrados demonstraram a existência de alta variabilidade genética na espécie, apresentando elevados índices de diversidade total.

Os resultados obtidos sugerem que esta espécie possui tendência à autogamia.

Futuras coletas para inclusão de plantas no BAG devem fornecer número de indivíduos suficiente para garantir uma representatividade da população de origem. No caso de coleta acrescentando plantas das populações representadas no BAG, o aumento do número amostral poderia confirmar ou mesmo modificar os resultados encontrados.

Os acessos que apresentam a maior diversidade genética são os provenientes de Pirarara, Pirarucu, Uatumã e Marabá.

O programa de melhoramento deve considerar que a estrutura genética dos acessos do BAG de camu-camu não está organizada no espaço, e que algumas populações possuem um elevado número de alelos privados. As estratégias de conservação de reservas genéticas devem garantir também a manutenção dos alelos raros.

4.4. Conclusão

Os dados gerados pelos microssatélites, marcadores moleculares seletivamente neutros, devem ser usados em combinação com informações fenotípicas para caracterizar as reservas genéticas, desta forma selecionando os acessos ou populações mais apropriados a serem utilizados em programas de melhoramento e de conservação da espécie.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belkhir, K.; Goudet, J.; Chikhi, L.; Bonhomme, F. 2000. Genetix (ver. 4.01), logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Montpellier, France.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*. 19: 11-15.
- Excoffier, L.G.L.; Schneider, S. 2005. Arlequin Ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 1: 47-50.
- Ferreira-Ramos, R.; Laborda, P. R.; Santos, M. O.; Mayor, M. S.; Mestriner, M. A.; Souza, A. P.; Alzate-Marin, A. L. 2008. Genetic analysis of forest species *Eugenia uniflora* L. through of newly developed SSR markers. *Conserv Genet*. 9:1281–1285.
- Glaubitz, J.C. 2004. CONVERT: A user-frindly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*. 4: 309-310.
- Goodman, S.J. 1997. R_{ST} Calc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and a determining their significance. *Molecular Ecology*. 6: 881-885.
- Govindajaru, R.D. 1989. Variation in gene flow levels among predominantly self-pollinated plants. *Journal of Evolutionary Biology*. 2: 173-181.
- Karasawa, M.M.G. 2005. Análise da estrutura genética de populações e sistema reprodutivo de *Oryza glumaepatula* por meio de microssatélites. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ. Piracicaba, SP. 91p.
- Kirst, M.; Cordeiro, C. M.; Rezende, G. D. S. P.; Grattapaglia, D. 2005. Power of Microsatellite Markers for Fingerprinting and Parentage Analysis in *Eucalyptus grandis* Breeding Populations. *Journal of Heredity*. 96(2):161–166.
- Marshall, D.K. & Brown, A.H.D. 1975. Optimum sampling strategies in genetic conservation. In: O.H. Frankel & J.G.R. Hawkes (Eds.) *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow*. Cambridge: Cambridge University Press. p. 53-70.

4.5. Referências bibliográficas

- Maués, M.M.; Couturier, G. 2002. Biologia floral e fenologia reprodutiva do Camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mac Vaugh) no Estado do Pará, Brasil. *Revista Brasi. Bot.*, 25(4):441-448.
- Michalakis, Y. & Excoffier, L. 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite *loci*. *Genetics*. 142: 1061-1064.
- Miller, M. P. 1997. *TFPGA 1.3: tools for population genetic analysis (software)*. New York.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetics*. 89: 583-590.
- Payn, K. G.; Dvorak, W. S.; Janse, B. J. H.; Myburg, A. A. 2008. Microsatellite diversity and genetic structure of the commercially important tropical tree species *Eucalyptus urophylla*, endemic to seven islands in eastern Indonesia. *Tree Genetics & Genomes*. 4:519–530.
- Peters, C. M.; Vasquez, A. 1987. Estudios ecológicos de camu-camu (*Myrciaria dubia*). I. Producción de frutos en poblaciones naturales. *Acta amazonica*. 16-17: 161-174.
- Raymond, M.; Rosset, F. 1995. *Genepop version 1.2: Population genetics software for exact test and ecumenicism*. *Journal of Hered.*86: 248-249.
- Rogers, J.S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. In: *Studies in Genetics VII*. Publ. 7213. University of Texas, Austin. p. 145-153.
- Rojas Gonzalez, S. Análise da variabilidade genética de acessos do banco de germoplasma de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) do INPA, utilizando marcadores microsatélites EST (EST-SSRs). 2007. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Manaus, AM. 106p.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Natural Biotechnology*. 18: 233-234
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequency. *Genetics*. 139: 457-462.
- Steane, D. A.; Conod, N.; Jones, R. C.; Vaillancourt, R. E.; Bradley M. Potts, B. M. 2006. A comparative analysis of population structure of a forest tree,

4.5. Referências bibliográficas

- Eucalyptus globulus (Myrtaceae), using microsatellite markers and quantitative traits. *Tree Genetics & Genomes*. 2: 30–38.
- Teixeira, A.S.; Chaves, L.S.; Yuyama, K. 2004. Esterases no exame da estrutura populacional de Camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh-Myrtaceae). *Acta Amazônica*, 34(1):89-96.
- Yuyama, K.; Aguiar, J.P.L.; Yuyama, K.L.O. 2002a. Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina C. *Acta Amazônica*, 32(1): 169-174.
- Yuyama, K. 2002b. Domesticação de germoplasma de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) para uso em agroindústria na Amazônia. In: *Livro de resultados dos Projetos de Pesquisa Dirigida (PPDs)*. SPC&T/PPG7. MCT/SCT, p.149-153.
- Whitlock, M.C. & McCauley, D.E. 1999. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \neq 1/(4Nm + 1)$. *Heredity*. 82: 117-125.
- Wright, S. 1978. Evolution and genetics of populations. Vol. IV. The Univ. of Chicago Press.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*. 15: 395-420.

Anexo 1. Frequências alélicas dos sete *loci* microssatélites estimados a partir de 214 acessos de 17 populações de *Myrciaria dubia*.

| Locus | Allelo | Cauamé | Pirara | Javari | Jamari | Machado | Urubu | IQUITOS | Madeira | Marabá | Aracá | Jaru | Candeias | Tarumã | Piraru. | Trombet. | Urupá | Uatumã | Total | Private? |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|----------|--------|---------|----------|--------|--------|--------|----------|
| 01_B05 | 179 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.3750 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0143 | Jaru |
| | 181 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.3750 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0143 | Jaru |
| | 187 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0263 | 0.1500 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0262 | |
| | 189 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0500 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0071 | IQUITOS |
| | 191 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0667 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0095 | IQUITOS |
| | 193 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0167 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0024 | IQUITOS |
| | 195 | 0.1154 | 0.0000 | 1.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2105 | 0.0500 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2500 | 0.0000 | 0.1429 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1286 | |
| | 197 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1579 | 0.1667 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0714 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1585 | 0.0857 |
| | 199 | 0.0385 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0658 | 0.0500 | 0.0000 | 0.3333 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0244 | 0.0357 |
| | 201 | 0.2308 | 0.0000 | 0.0000 | 1.0000 | 0.0000 | 0.0526 | 0.0333 | 0.0000 | 0.2500 | 0.6250 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0610 | 0.0833 |
| | 203 | 0.1538 | 0.1667 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1184 | 0.1167 | 0.0000 | 0.2500 | 0.2500 | 0.0000 | 0.2500 | 0.0000 | 0.2500 | 0.0000 | 0.2000 | 0.2000 | 0.1341 | 0.1286 |
| | 205 | 0.1154 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0263 | 0.2333 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2857 | 0.2500 | 0.6000 | 0.0000 | 0.0122 | 0.0762 |
| | 207 | 0.0385 | 0.1667 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.3026 | 0.0667 | 0.0000 | 0.1667 | 0.1250 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.3571 | 0.0000 | 0.4000 | 0.0000 | 0.0122 | 0.1024 |
| | 209 | 0.0769 | 0.4167 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0395 | 0.0000 | 0.5000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1250 | 0.0714 | 0.2500 | 0.0000 | 0.2000 | 0.0366 | 0.0619 | |
| | 211 | 0.1538 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.5000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0732 | 0.0405 |
| | 213 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2857 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0095 | Machado |
| | 215 | 0.0769 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2143 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.6000 | 0.0244 | 0.0310 | |
| | 219 | 0.0000 | 0.2500 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2500 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0119 | |
| | 221 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0714 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0366 | 0.0095 |
| | 229 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2083 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0244 | 0.0286 |
| 235 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.5000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2083 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0488 | 0.0381 | |
| 237 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1341 | 0.0262 | Uatuma | |
| 239 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2083 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0244 | 0.0286 | | |
| 01_C03 | 133 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0366 | 0.0071 | Uatuma |
| | 137 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1667 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.8333 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0165 | |
| | 139 | 0.0769 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0244 | 0.0094 | |
| | 141 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0128 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0024 | Urubu |
| | 143 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.8333 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1600 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1463 | 0.0755 | |
| | 145 | 0.0769 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1429 | 0.0000 | 0.0000 | 1.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0189 | |
| | 147 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1429 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0122 | 0.0071 | |
| | 149 | 0.1154 | 0.0833 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2857 | 0.0769 | 0.0167 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1250 | 0.0400 | 0.0000 | 0.1667 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0244 | 0.0519 | |
| | 151 | 0.3462 | 0.8333 | 0.0000 | 1.0000 | 0.5714 | 0.1026 | 0.0000 | 0.0000 | 0.6667 | 0.8750 | 0.6800 | 0.4286 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.6000 | 0.2073 | 0.3066 | |
| | 153 | 0.1923 | 0.0833 | 0.2000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0256 | 0.0167 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1429 | 0.0000 | 0.5000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0401 | |
| | 155 | 0.1154 | 0.0000 | 0.3000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2692 | 0.1167 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0714 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0825 | |
| | 157 | 0.0385 | 0.0000 | 0.1000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2051 | 0.8500 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0200 | 0.1429 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0122 | 0.1722 | |
| | 159 | 0.0385 | 0.0000 | 0.2000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1923 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0800 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1585 | 0.0825 | |
| | 161 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1026 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0200 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.4000 | 0.3537 | 0.0991 | |
| | 163 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0128 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0024 | Urubu |
| | 165 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0714 | 0.0000 | 0.5000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0118 | |
| | 167 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0122 | 0.0024 | Uatuma |
| 169 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.3333 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0094 | Araca | |
| 177 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0122 | 0.0024 | Uatuma | |

CONTINUA

| Locus | Alelo | Cauamé | Pirara | Javari | Jamari | Machado | Urubu | Iquitos | Madeira | Marabá | Aracá | Jaru | Candeias | Tarumã | Piraru. | Trombet. | Urupá | Uatumã | Total | Private? |
|--------|-------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|----------|--------|---------|----------|--------|--------|--------|----------|
| | 193 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.5000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.3200 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0244 | 0.0485 | |
| | 195 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0513 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0146 | |
| | 199 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.3333 | 0.0000 | 0.0200 | 0.5000 | 0.0000 | 0.5000 | 0.0000 | 0.3537 | 0.1092 | |
| | 201 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.5000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1250 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0121 | |
| | 203 | 0.0000 | 0.2500 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2000 | 0.0000 | 0.1250 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0366 | 0.0413 | |
| | 205 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0385 | 0.0000 | 0.5000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1800 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0122 | 0.0364 | |
| | 207 | 0.0000 | 0.0833 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.5256 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0800 | 0.0000 | 0.2500 | 0.0000 | 0.5000 | 0.0488 | 0.1359 | |
| | 209 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0513 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0600 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0170 | |
| | 211 | 0.3846 | 0.4167 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0256 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0244 | 0.0461 | |
| | 213 | 0.0769 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0049 | Cauamé |
| 01_H01 | 215 | 0.2308 | 0.2500 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1282 | 0.1429 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0600 | 0.0000 | 0.1250 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0244 | 0.0801 | |
| | 217 | 0.0769 | 0.0000 | 0.0000 | 0.5000 | 0.0000 | 0.0769 | 0.4286 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.3750 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1019 | |
| | 219 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0256 | 0.2500 | 0.0000 | 0.5000 | 0.1667 | 0.0000 | 0.0000 | 0.5000 | 0.0000 | 0.5000 | 0.0000 | 0.3537 | 0.1505 | |
| | 221 | 0.0769 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0714 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1667 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.3750 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0122 | 0.0291 | |
| | 223 | 0.0769 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0049 | Cauamé |
| | 225 | 0.0769 | 0.0000 | 0.4000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0513 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0122 | 0.0267 | |
| | 227 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.5000 | 0.0000 | 0.0714 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0243 | |
| | 229 | 0.0000 | 0.0000 | 0.4000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0400 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0122 | 0.0170 | |
| | 231 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0400 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0122 | 0.0073 | |
| | 233 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.3125 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0121 | Jaru |
| | 235 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.5000 | 0.0256 | 0.0357 | 0.0000 | 0.0000 | 0.3333 | 0.0625 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0488 | 0.0461 | |
| | 237 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.5000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2500 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.5000 | 0.0244 | 0.0340 | |
| | 181 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0047 | Javari |
| | 183 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0128 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0023 | Urubu |
| | 185 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0385 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0093 | |
| | 189 | 0.0000 | 0.0000 | 0.4000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.4000 | 0.0244 | 0.0234 | |
| | 191 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0128 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0023 | Urubu |
| | 193 | 0.0769 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0641 | 0.0000 | 0.5000 | 0.2500 | 0.0000 | 0.3125 | 0.2000 | 0.2143 | 0.0000 | 0.0000 | 0.4000 | 0.0732 | 0.0935 | |
| | 195 | 0.3846 | 1.0000 | 0.1000 | 0.9000 | 0.5000 | 0.1795 | 0.0833 | 0.5000 | 0.0000 | 0.6667 | 0.3750 | 0.0400 | 0.1429 | 0.5000 | 0.0000 | 0.2000 | 0.1220 | 0.2196 | |
| | 197 | 0.3077 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.5000 | 0.1282 | 0.1500 | 0.0000 | 0.1667 | 0.3333 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1429 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0976 | 0.1168 | |
| | 199 | 0.1538 | 0.0000 | 0.1000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1154 | 0.4833 | 0.0000 | 0.1667 | 0.0000 | 0.3125 | 0.2800 | 0.0000 | 0.5000 | 0.3000 | 0.0000 | 0.3902 | 0.2407 | |
| | 201 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2436 | 0.0833 | 0.0000 | 0.1667 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2143 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1463 | 0.0981 | |
| | 203 | 0.0769 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1282 | 0.1333 | 0.0000 | 0.0833 | 0.0000 | 0.0000 | 0.4200 | 0.2143 | 0.0000 | 0.7000 | 0.0000 | 0.0854 | 0.1379 | |
| | 205 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0256 | 0.0333 | 0.0000 | 0.0833 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0600 | 0.0714 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0244 | 0.0257 | |
| | 207 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0256 | 0.0167 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0366 | 0.0140 | |
| | 209 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0167 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0023 | Iquitos |
| | 211 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1000 | 0.0000 | 0.0128 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0833 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0070 | |
| | 213 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0128 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0023 | Urubu | |

Anexo 2. Alelos privados e frequência com que ocorrem em cada população.

| <i>Locus</i> | Alelo | Frequência | População |
|--------------|-------|------------|-----------|
| 01_B05 | 179 | 0,3750 | Jaru |
| 01_B05 | 181 | 0,3750 | Jaru |
| 01_B05 | 189 | 0,0500 | Iquitos |
| 01_B05 | 191 | 0,0667 | Iquitos |
| 01_B05 | 193 | 0,0167 | Iquitos |
| 01_B05 | 213 | 0,2857 | Machado |
| 01_B05 | 237 | 0,1341 | Uatumã |
| 01_C03 | 133 | 0,0366 | Uatumã |
| 01_C03 | 141 | 0,0128 | Urubu |
| 01_C03 | 163 | 0,0128 | Urubu |
| 01_C03 | 167 | 0,0122 | Uatumã |
| 01_C03 | 169 | 0,3333 | Aracá |
| 01_C03 | 177 | 0,0122 | Uatumã |
| 01_F02 | 167 | 0,0385 | Cauamé |
| 01_F02 | 175 | 0,2857 | Tarumã |
| 01_F02 | 185 | 0,1585 | Uatumã |
| 01_F02 | 195 | 0,5000 | Javari |
| 01_F02 | 197 | 0,3000 | Javari |
| 01_F02 | 199 | 0,0122 | Uatumã |
| 01_F02 | 201 | 0,2000 | Javari |
| 01_F09 | 161 | 0,2586 | Iquitos |
| 01_F09 | 163 | 0,0345 | Iquitos |
| 01_F09 | 165 | 0,0517 | Iquitos |
| 01_F09 | 183 | 0,3333 | Marabá |
| 01_F09 | 187 | 0,0128 | Urubu |
| 01_F09 | 199 | 0,0690 | Iquitos |
| 01_F09 | 207 | 0,0256 | Urubu |
| 01_F09 | 211 | 0,2586 | Iquitos |
| 01_F09 | 213 | 0,0897 | Urubu |
| 01_F09 | 215 | 0,0128 | Urubu |
| 01_G03 | 143 | 0,0714 | Machado |
| 01_G03 | 225 | 0,0256 | Urubu |
| 01_G03 | 251 | 0,1667 | Marabá |
| 01_G03 | 253 | 0,0769 | Cauamé |
| 01_G03 | 255 | 0,0345 | Iquitos |
| 01_H01 | 213 | 0,0769 | Cauamé |
| 01_H01 | 223 | 0,0769 | Cauamé |
| 01_H01 | 233 | 0,3125 | Jaru |
| 02_C02 | 181 | 0,2000 | Javari |
| 02_C02 | 183 | 0,0128 | Urubu |
| 02_C02 | 191 | 0,0128 | Urubu |
| 02_C02 | 209 | 0,0167 | Iquitos |
| 02_C02 | 213 | 0,0128 | Urubu |

Anexo 3. Agrupamentos das populações determinadas pelo programa Structure.

