



Corpoica. Ciencia y Tecnología
Agorpecuaria

ISSN: 0122-8706

revista_corpoica@corpoica.org.co

Corporación Colombiana de Investigación
Agropecuaria
Colombia

Rojas, Salvador; Clement Ch., Yuyama K.; Ossamu Nagao, Eduardo
Diversidade genética em acessos do banco de germoplasma de camu-camu (*Myrciaria
dubia* [H.B.K.] McVaugh) do INPA usando marcadores microsatélites (EST-SSR)
Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria, vol. 12, núm. 1, enero-junio, 2011, pp. 51-
64

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria
Cundinamarca, Colombia

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=449945030006>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

ARTÍCULO CIENTÍFICO

**Genetic diversity of the INPA
germplasm bank of camu-camu
(*Myrciaria dubia* [H.B.K.] McVaugh) using
microsatellites markers (EST-SSR)**

**Diversidade genética em acessos
do banco de germoplasma de
camu-camu (*Myrciaria dubia*
[H.B.K.] McVaugh) do INPA usando
marcadores microssatélites (EST-SSR)**

Salvador Rojas¹, Yuyama K. Clement Ch.², Eduardo Ossamu Nagao³

ABSTRACT

The knowledge of genetic diversity in Amazonian species is of great importance for domestication and breeding purposes. A great difficulty with non-domesticated species such as "camu-camu" is the lack of information about their genetic variability. Due to the economic potential of camu-camu, a fruit with a high level of vitamin C production, the aim of this study was to estimate the genetic diversity using the molecular markers EST-SSR, to study the genetic variability of 139 accessions from 17 "camu-camu" materials from different rivers in the Brazilian's Amazon region, preserved at the INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia Brasileira) Active Germoplasm Bank (BAG) of "camu-camu" in Manaus. Eight of the EST-SSR polymorphic loci used had 102 alleles detected with an average of 12.87 alleles per locus. The results show high levels of diversity for all loci with an average expected heterozygosity (H_e) of 0.797 and a total heterozygosity (H_t) value of 0.502. Populations had high inbreeding values, suggesting a heterozygotes deficiency as observed by the heterozygosity (H_o), perhaps as result of the great distance and isolation among populations, which limits gene flow and favors inbreeding. A high genetic differentiation value (F_{ST}) of 0.21, indicates high variability among populations. Measures based on the alleles frequency, showed a larger variability within populations (80.3%) than among populations (19.7%). Genetic distances between populations showed high differences within accessions coming from Rondonia (Jaru) and those from Amazonas (and Pirarucu Tarumã) and Roraima (Urubu). The dendrogram made by the UPGMA method, showed two major groups and five subgroups related geographically. Results proved EST-SSR marker's utility in genetic diversity studies among BAG of camu-camu. These results will be useful in planning new collections, germplasm conservation and population variability analysis, as well as directional crossover using divergent genotypes; which will contribute to camu-camu breeding in Amazonian countries.

Keywords: genetic resources, genetic markers, population, genetic variation, inbreeding.

RESUMO

O conhecimento da diversidade genética das espécies amazônicas é de grande importância para a domesticação e melhoramento das culturas. Uma das grandes dificuldades em espécies não domesticadas como o camu-camu é a falta de informação sobre a sua variabilidade genética. Devido ao potencial econômico do camu-camu por sua alta produção de vitamina C, foi realizado o presente trabalho, o qual tem como objetivo estimar a variabilidade genética de 139 acessos de camu-camu oriundos de 17 populações de diferentes rios da Amazônia brasileira, conservados no banco de germoplasma (BAG) de camu-camu do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia INPA na cidade de Manaus, utilizando marcadores EST-SSR. Oito loci de EST-SSR detectaram um total de 102 alelos com uma média de 12,87 alelos por loco. Os resultados mostram altos níveis de diversidade para todos os loci com uma média de heterozigosidade esperada (H_e) de 0,797 e heterozigosidade total (H_t) de 0,502. As populações apresentaram altos valores de endogamia, o que sugere déficit de heterozigotos como observado pelos baixos valores de Heterozigosidade observada (H_o), provavelmente devido ao isolamento das populações e as distâncias entre elas, o que limita o fluxo gênico favorecendo a endogamia. O valor de diferenciação genética (F_{ST}) foi alto 0,21 indicando uma alta variabilidade entre as populações. As medidas baseadas nas frequências alélicas, amostraram uma maior variabilidade dentro das populações (80,3%) que entre as populações (19,7%). Através das distâncias genéticas entre as populações foi encontrada uma grande variação entre os acessos provenientes de populações de Rondônia (Jarú) e os provenientes de Amazonas (Pirarucu e Tarumã) e Roraima (Urubu). No ordenamento pelo método UPGMA, observou-se a formação de dois grupos principais e cinco sub-grupos os quais estão relacionados geograficamente. Os resultados revelaram a utilidade dos marcadores EST-SSR nos estudos de diversidade genética entre acessos do camu-camu. Estes resultados serão úteis no planejamento de novas coletas e conservação do BAG, no análise de variabilidade de populações, assim como no direcionamento de cruzamentos através da escolha de genótipos geneticamente divergentes, o que contribuirá às atividades de melhoramento de camu-camu nos países amazônicos.

Palavras chaves: recurso genético, marcador molecular, população, variação genética, endogamia.

**Diversidad genética de accesiones del banco
de germoplasma de camu-camu (*Myrciaria
dubia* [H.B.K.] McVaugh) de INPA utilizando
marcadores microssatélites (EST-SSR)**

RESUMEN

El conocimiento de la diversidad genética de las especies amazónicas es de gran importancia para la domesticación y el mejoramiento de estos cultivos. Una de las grandes dificultades con estas especies no domesticadas como el camu-camu es la carencia de la información sobre su variabilidad genética. Debido al potencial económico del camu-camu

Fecha de recepción 2010-10-02
Fecha de aceptación 2010-10-23

¹ Centro de Investigación La Libertad, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Corpoica. Villavicencio (Colombia). srojas@corpoica.org.co
² Coordenação de Pesquisas em Ciências Agronômicas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Manaus (Brasil). kyuyama@inpa.gov.br
³ Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Manaus (Brasil). eonagao@ufam.edu.br

por su alta producción de la vitamina C, el objetivo del presente estudio fue estimar la diversidad genética utilizando marcadores moleculares EST-SSR, de 139 accesiones provenientes de 17 poblaciones de camu-camu de diversos ríos de la Amazonía Brasileña y conservados en el banco activo de germoplasma (BAG) de camu-camu del Instituto Nacional de Investigaciones de la Amazonía Brasileña INPA de la ciudad de Manaus. Los ocho loci polimórficos EST-SSR utilizados detectaron un total de 102 alelos con un promedio de 12,87 alelos por locus. Los resultados muestran altos niveles de diversidad para todos los loci con un promedio de heterocigosidad esperada (H_e) de 0,797 y un valor de heterocigosidad total (H_t) de 0,502. Las poblaciones presentaron altos valores de endogamia, lo que sugiere un déficit de heterocigotos como se observó en los valores bajos de heterocigosis observada (H_o), probablemente debido al aislamiento de las poblaciones y las distancias entre ellas, lo que limita el flujo del génico favoreciendo la endogamia. El valor de diferenciación genética (F_{ST}) fue alto 0,21 lo que indica una alta variabilidad entre las poblaciones. Las medidas basadas en las frecuencias de los alelos, demuestran una variabilidad más grande dentro de las poblaciones (80,3%) que entre las poblaciones (19,7%). Con las distancias genéticas entre las poblaciones fue encontrada una gran variación entre las accesiones que procedían de poblaciones de Rondonia (Jarú) y las provenientes de Amazonas (Pirarucu y Tarumã) y Roraima (Urubu). En el dendrograma hecho por el método UPGMA, se observó la formación de dos grupos principales y cinco subgrupos que se relacionan geográficamente. Los resultados revelaron la utilidad del EST-SSR en los estudios de la diversidad genética entre las accesiones del BAG de camu-camu. Estos resultados serán útiles en el planeamiento de nuevas colectas y la conservación de germoplasma, en análisis de variabilidad de poblaciones, así como en el direccionamiento de cruces utilizando genotipos divergentes, que contribuirá a las actividades de la mejora del camu-camu en los países de la Amazonía.

Palabras clave: recursos genéticos, marcadores moleculares, población, variación genética, endogamia.

INTRODUÇÃO

O camu-camu é classificado como uma espécie não domesticada usada pelas populações indígenas e locais do Peru e Brasil em forma extrativista a partir de plantas crescendo naturalmente nas margens dos rios e lagos ou cultivado em pequenas áreas de terra firme. Esta espécie possui alto potencial econômico pelo elevado conteúdo de vitamina C (até 3 g por 100 g de polpa). Atualmente a produção é destinada para os mercados locais do Brasil e Peru, e parte da produção do Peru para exportação como polpa a Europa, Estados Unidos e Japão (Cedecam, 2007). Apesar da sua importância econômica, não existem informações sobre variação genética a nível molecular que ajudem o processo de melhoramento na obtenção de cultivares com caracteres selecionados para suprir as demandas futuras de fruta.

Em países como Colômbia, Peru e Brasil nos últimos anos criaram-se coleções de germoplasma, para a conservação e uso da variabilidade genética do camu-camu. No Brasil, o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) Manaus-AM, iniciou atividades de coleta para a criação do banco ativo de germoplasma (BAG) a partir de acessos provenientes de populações de diferentes rios onde cresce naturalmente o camu-camu. Atualmente, o BAG tem 139 acessos, os quais estão sendo utilizados para a conservação

da variabilidade genética e avaliações preliminares de caracteres importantes de produção em alguns acessos (Caliri, 2002). As avaliações de caracteres morfológicos têm demonstrado grandes diferenças nas características de crescimento e produção dos acessos (Yuyama *et al.*, 2003). Recentemente, Teixeira *et al.* (2004) avaliaram três populações de camu-camu (Uatumã, Iquitos e Boa Vista) e observaram variação genética entre as sub-populações estudadas utilizando marcadores isoenzimáticos. Neste caso, estudos moleculares envolvendo populações de camu-camu de diferentes áreas geográficas poderiam detectar possíveis padrões de variação genética entre as populações associadas às diferentes regiões da Amazônia.

Hoje, os marcadores moleculares são as ferramentas mais utilizadas para este fim, pois apresentam vantagens sobre os marcadores morfológicos, devido detectarem o polimorfismo ao nível do genótipo, e serem independentes dos efeitos ambientais e o estagio fisiológico da planta. Desses marcadores, os microsatélites ou SSR (Simple Sequence Repeat) são ideais para a análise genética em plantas devido sua disponibilidade e abundância ao longo do genoma, serem de natureza polimórfica, co-dominantes e detectados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (Reddy *et al.*, 2001).

No caso de camu-camu, não existem estudos moleculares usando microsatélites, no entanto, os marcadores SSR têm sido usados com sucesso em diferentes estudos genéticos em Myrtaceas, tais como melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), eucalipto (*Eucalyptus grandis*) e goiba (*Psidium guajava*) (Rossetto *et al.*, 1999; Kirst *et al.*, 2004; Sanabria *et al.*, 2006). Os EST-SSR são um tipo de microsatélites provenientes de áreas mais conservadas do genoma e portanto podem ser obtidos livremente de EST da mesma espécie ou transferidos de outras espécies e podem ser aplicados na genômica funcional, mapeamento genético, análise de QTL e análise de biodiversidade. Os EST-SSR são menos polimórficos que os SSR genômicos, são amplamente usados para estudos de estimação de diversidade, principalmente pelos baixos custos e a possibilidade de ser transferidos a outras espécies. Tem sido usado em espécies como melão (*Cucumis melo*), samambaia (*Athyrium distentifolium*), algodão (*Gossypium arboreum*) e tomate (*Solanum lycopersicum*) (Gonzalo *et al.*, 2005; Woodhead *et al.*, 2005; Qureshi *et al.*, 2004). Em alguns casos detectam alto polimorfismo como nas espécies de *Actinidia* sp. e batata silvestre (*Ipomoea trifida*) (Fraser *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2004).

As variações nas características de produção da planta observadas no BAG podem ser estudadas com os EST-SSR para detectar os níveis de variabilidade e a distribuição desta variação entre os acessos e suas populações de origem. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo utilizar estes marcadores para estimar a variabilidade genética dos acessos de camu-camu do BAG do

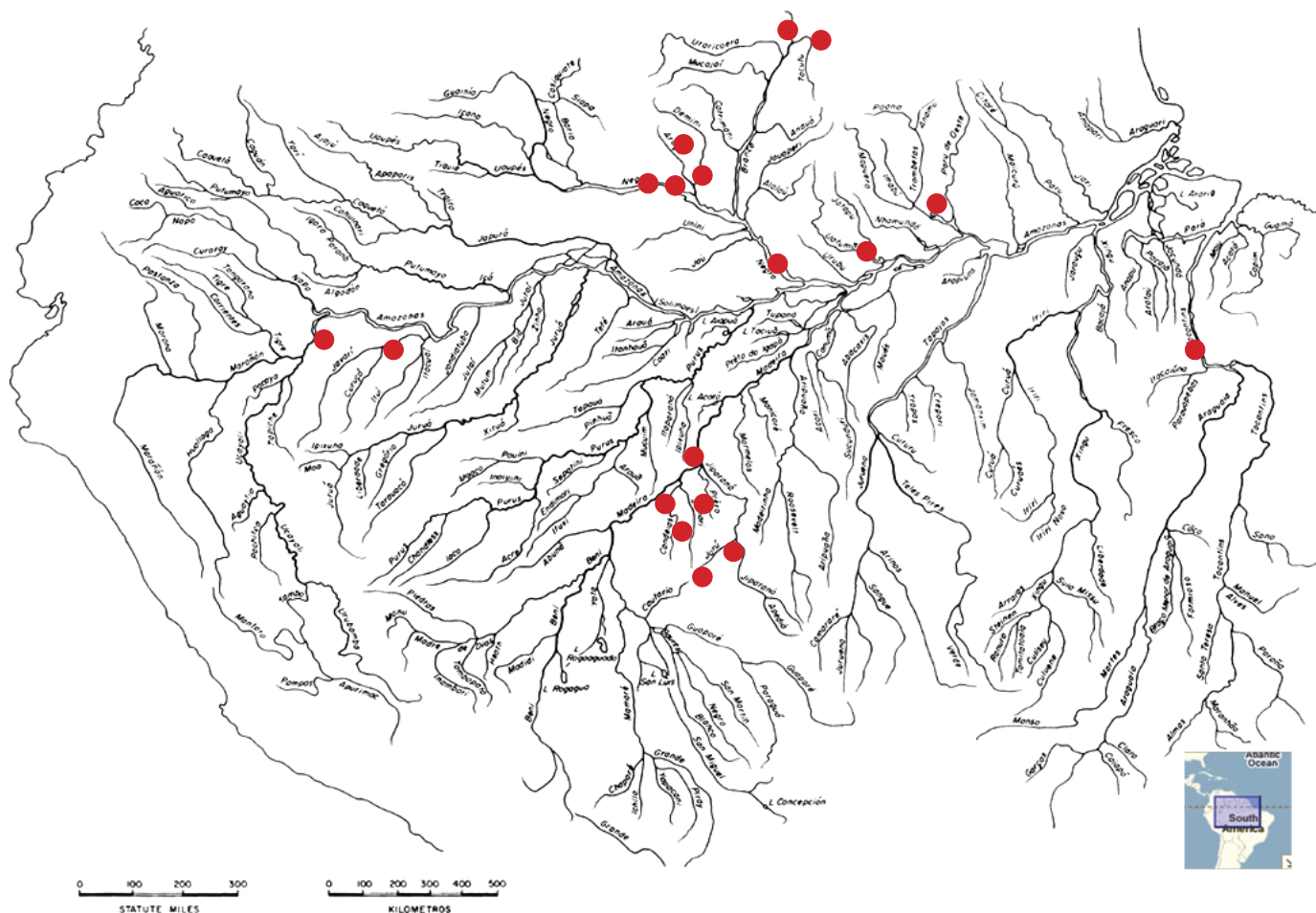


Figura 1. Áreas de coleta (pontos vermelhos) dos acessos de camu-camu nos rios da Amazônia.

INPA, gerando informações para o manejo e conservação da diversidade da espécie, a orientação de novas coletas, a redução da quantidade de material genético duplicado. Além disso, estes resultados subsidiarão as futuras atividades de melhoramento como seleção de parentais distantes, na busca de cultivares mais produtivos, com características de qualidade que satisfaçam às demandas do setor produtivo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal e extração de DNA

Para este trabalho foram utilizados 139 acessos de camu-camu, coletados nos últimos 10 anos em 17 populações de diferentes rios da Amazônia (Figure 1). Cada população esta representada por um número diferente de acessos e cada acesso possui cinco plantas, as quais são conservadas no BAG de camu-camu de INPA em Manaus Amazonas Brasil em dois lugares: na Estação Experimental de Hortaliças do INPA, localizada no km 14 da AM-010; e na Estação Experimental de Fruticultura do INPA, localizada no km 40 da BR-174 (Tabela 1).

Tabela 1. Origem dos acessos da população no banco ativo de germoplasma (BAG) de camu-camu Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Brasil.

Estado	População	N
Rondônia	Candeias	17
	Jaru	5
	Machado	6
	Urupá	4
	Jamari	4
Fontera Peru –Brasil	Madeira	5
	Iquitos	6
Pará	Javari	5
	Trombetas	4
	Marabá	6
Amazonas	Acari	5
	Pirara	5
	Pirarucu	3
	Tarumã	5
Roraima	Uatuman	35
	Urubu	11
	Caume	13

Para a obtenção de DNA, folhas jovens de uma planta por cada acesso foram coletadas e armazenadas para serem usadas na extração. A extração de DNA foi realizada a partir de 100 mg de folhas jovens, macerando-se com nitrogênio líquido, usando o protocolo CTAB 2% descrito por Doyle y Doyle (1990), com algumas modificações. Após a extração, o DNA foi quantificado em gel de agarose 0,9% corado com brometo de etídio.

Amplificação dos loci microssatélites

Oito “primers” microssatélites-EST codominantes de camu-camu, desenvolvidos por Rojas *et al.* (2008), foram utilizados para detecção de polimorfismo por reação de PCR. Adicionou-se a extremidade 5’ do “primer forward” de cada locus a seqüência M13 (5’ TGTAACGACGGCCAGT 3’), e uma outra seqüência M13 foi marcada com fluorocromo específico (6-FAM ou HEX), segundo o protocolo de Schuelke (2000) com algumas modificações.

A reação de PCR foi conduzida utilizando-se um volume total de 10 µL, contendo: 1 µL de tampão 10X (TrisHCl 100 mM, KCl 500 mM, pH 8,4), 1 µL dNTP (2,5 µM), 1 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,25 µL primer forward M13 (5 µM), 0,25 µL primer forward M13 marcado com fluorocromo Hex (5 µM), 0,5 µL primer reverse (5 µM), 1,5 U Taq DNA Polimerase (Biotools, Espana), e 4,0 µL de DNA (15 ng µL⁻¹). As amplificações foram realizadas em termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf, seguindo o programa: um ciclo de 94°C por 2 minutos, seguido de 25 ciclos de 94°C por 10 s, temperatura de anelamento do primer T_a por 20 s, e 72°C por 30 s, depois um ciclo de 72°C por 10 minutos, seguido de 20 ciclos de 94°C por 10 s, 50°C por 10 s, e 72°C por 30 s e uma extensão a 72°C por 30 minutos. Os produtos de PCR gerados foram visualizados em seqüenciador automático (Mega Bace 1000, GE Healthcare, England). A estimativa do tamanho dos alelos (em pares de bases) foi realizada com o programa Fragment Profiler (GE Healthcare, England), auxiliado pelo marcador de peso molecular (Size Standard) ET-400-ROX (GE Healthcare, England).

Análise genética dos dados

Com base nos dados de genotipagem foram estimados: número de alelos (A), alelos privados (P), Alelos por população no BAG (At) e Alelos por acesso dentro de cada população (Ai). Também foram calculadas as frequências alélicas por locus e por populações, com o programa CONVERT (Glaubitz, 2004) e GDA (Lewis y Zaykin, 1999).

Os alelos foram classificados em comuns e raros quando suas frequências foram maiores de 5%, ou menores de 5%, respectivamente. Também foram classificados pela sua presença nas 17 populações em privados (aquele alelo que

só existe em uma população), esporádico (que aparece entre duas a seis populações), e difundido (presente em mais de sete populações), similar ao esquema de Marshall y Brown (1975).

As heterozigosidades esperadas (H_e) e observadas (H_o) e o coeficiente de endogamia (f) foram calculadas para cada locus e para cada população com o programa GDA (Lewis y Zaykin, 1999).

Para determinar a estrutura genética molecular entre os acessos dentro e entre populações, foram utilizados os parâmetros de F (Wright, 1951), F_{ST} estimativa de divergência entre populações, F_{IS} e F_{IT} estimativa de excesso de heterozigotos (< 0) e deficiência (> 0) dentro de cada população e no conjunto de populações (Weir y Cockerman, 1984), respectivamente foram calculados com os programas GDA (Lewis y Zaykin, 1999) e Arlequin v.3.01 (Excoffier *et al.*, 2005). Também foi determinado outro análogo do F_{ST} o R_{ST} (Slatkin, 1995) e o N_m número de migrantes por geração, para estes cálculos foi usado o programa RSTCALC 2.2 (Goodman, 1997). Igualmente uma análise hierárquica da variância molecular (AMOVA, Michalakis y Excoffier, 1996) foi efetuada, usando o programa Arlequin v.3.01 (Excoffier *et al.*, 2005), para determinar a porcentagem de variação entre e dentro das populações e acessos.

Para verificar as divergências entre acessos e populações, foram calculadas as distâncias genéticas a partir das frequências alélicas observadas de cada loco (D) (Nei, 1978) utilizando o programa GDA (Lewis y Zaykin, 1999). Também foi estimada distância de alelos compartilhados (D_{AS}) (Chakraborty y Jin, 1993) entre populações e acessos com auxílio do programa Populations 1.2.28 (Langella, 2002).

As populações e acessos foram agrupadas pelo método UPGMA usando o programa GDA (Lewis y Zaykin, 1999), foram construídos a partir das distâncias genética de Nei (1978): um dendrograma multi-loci e um dendrograma para cada locus. Testou-se a significância de correlação e a curva de regressão entre as matrizes de distâncias genéticas e as distâncias geográficas, medidas pelos rios e em linha reta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversidade dos Loci

Os oito loci EST-SSR detectaram um total de 102 alelos nos 139 acessos, com uma média de 12,8 alelos por loci (Tabela 2). O polimorfismo foi observado em todos os loci com o número de alelos variando de sete (locus MDI003) a 21 (locus MDI0015) alelos. A alta proporção de loci polimórficos indicam que os EST-SSR usados podem detectar variação

Tabela 2. Índices de diversidade genética, coeficiente de endogamia, e diferenciação genética de oito *loci* EST-SSR em 139 acessos camu-camu mantidos banco ativo de germoplasma de INPA.

LÓCUS	N	A	H_e	H_o	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	G_{ST}	R_{ST}	f
MDI003	139	7	0,791	0,496	0,230	0,406	0,228	0,31	0,309	0,377
MDI004	139	8	0,691	0,464	0,176	0,349	0,210	0,298	0,043	0,329
MDI006	139	14	0,793	0,266	0,607	0,678	0,179	0,311	0,548	0,665
MDI007	139	11	0,757	0,302	0,511	0,619	0,221	0,224	0,316	0,601
MDI009	139	19	0,903	0,539	0,343	0,419	0,116	0,245	0,249	0,403
MDI0010	139	11	0,811	0,374	0,455	0,558	0,189	0,292	0,301	0,539
MDI0013	139	11	0,735	0,352	0,355	0,549	0,300	0,369	0,076	0,521
MDI0015	139	21	0,892	0,478	0,327	0,492	0,245	0,322	0,442	0,464
Meia		12,75	0,797	0,409	0,377	0,502	0,210	0,308	0,285	0,488
Total		102								

N - Numero de indivíduos, A - Numero de alelos; H_e - Heterozigosidade esperada; H_o - Heterozigosidade observada; F_{IS} - Diversidade genética dentro da população; F_{IT} - Diversidade genética entre indivíduos, F_{ST} , G_{ST} e R_{ST} Diversidade genética entre as 17 populações, f - Índice de fixação ou endogamia de Weir e Cockerham (1984).

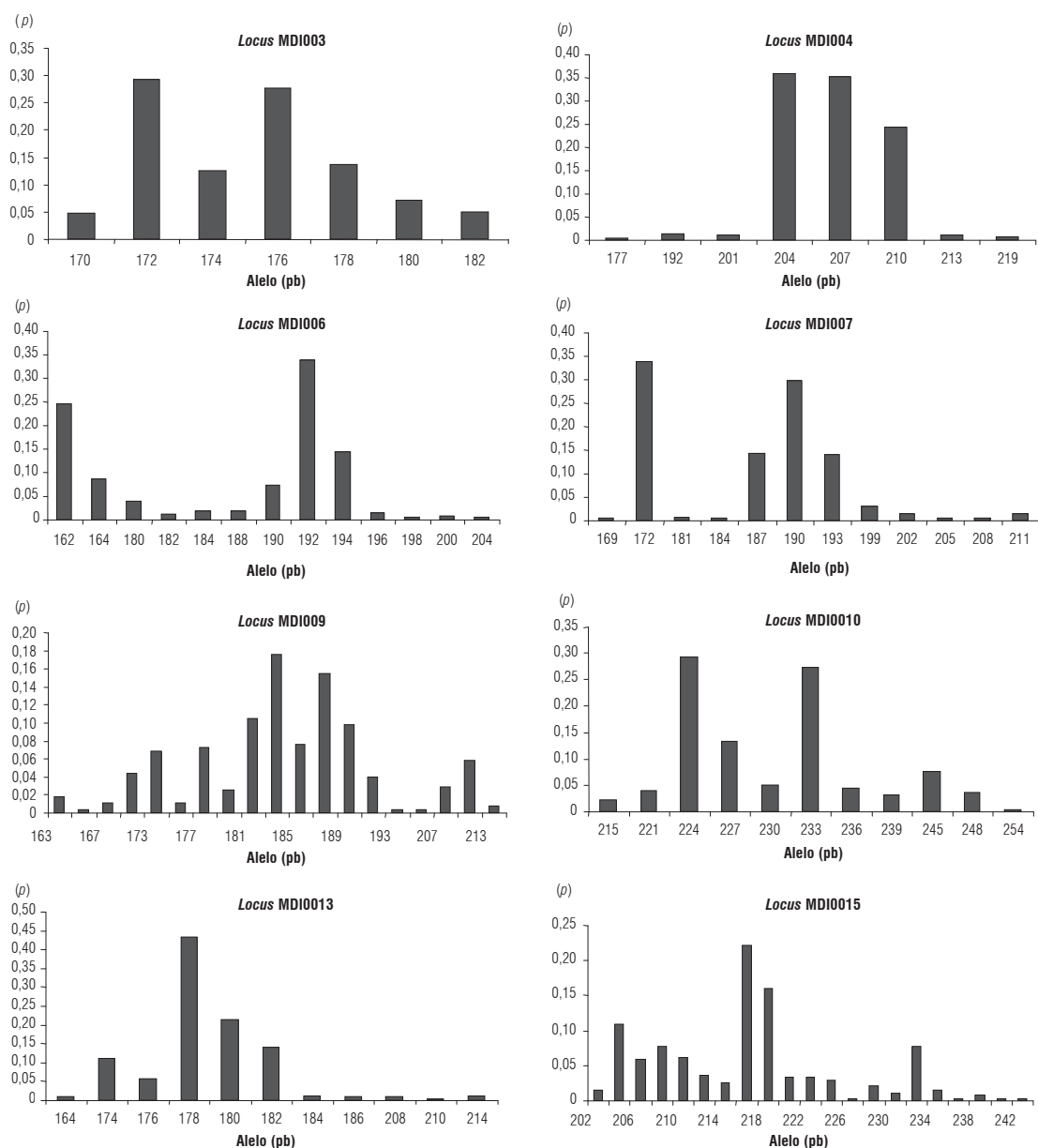


Figura 2. Histogramas de distribuição das frequências alélicas (p) de oito *loci* EST-SSR em 139 acessos de camu-camu do banco ativo de germoplasma de INPA.

alélica entre os acessos de camu-camu. Não existem muitos dados de EST-SSR em Myrtaceas, mas comparando com uso de SSR, os quais são considerados mais polimórficos, estes EST-SSR de camu-camu mostraram-se igual e em algumas casos maior polimorfismo que em outras Myrtaceas. Em *Calotahamus* sp., os SSR testados tiveram uma média similar ao do camu-camu 12,7 (Elliott y Byrne, 2005) e em espécies domesticadas como *P. guajava* este valor foi de 4,5 alelos por loci (Risterucci *et al.*, 2005).

Este alto polimorfismo dos EST-SSR de camu-camu pode ser explicado pela amplitude geográfica das áreas de coleta na Amazônia e pelo baixo nível de domesticação e melhoramento de esta espécie. Como é descrito para outras espécies silvestres ou menos domesticadas como *I. trifida* e *Actinidia* sp. (Hu *et al.*, 2004; Fraser *et al.*, 2003).

As distribuições das freqüências alélicas variaram entre os loci (Figura 2). Os loci MDI004 e MDI0013 tiveram uma distribuição menos uniforme, indicando maior freqüência de uns poucos alelos. Nos outros loci as freqüências foram mais bem distribuídas sempre predominando 2 a 3 alelos por cada locus. Os locos MDI009, e MDI 0015 tiveram a melhor distribuição dos alelos. Este alto número de alelos e a uniforme distribuição das freqüências entre 0,05 e 0,43 podem influir nos altos valores de H_e encontrados nestes loci. As freqüências dos 102 alelos, 93% tiveram uma freqüência entre 0,05 e 0,43 (Tabela 3). Em eucalipto as freqüências alélicas foram menores de 0,30 com relativa homogeneidade, resultando também numa alta Heterozigiosidade (Brondani *et al.*, 1998).

De acordo à presença dos alelos nas populações, 22% foram privados (pertencentes uma única população), 45% foram esporádicos, e 33% foram difundidos (Tabela 3). O número de alelos privados totais foi de 23, as populações de Uatumã e Marabá tiveram 6 e 4 alelos privados, respectivamente. Apesar de serem mais conservados, os EST-SSR detectaram um alta quantidade de alelos privados, os quais, por estar em 10 das 17 populações e geralmente em baixas freqüências, têm maior risco de perda, portanto devem ser monitorados no BAG, porque podem representar algum tipo de endemismo das populações presentes no BAG. A presença destes alelos privados em algumas

populações de camu-camu pode estar relacionada com algum grau de evolução ou adaptação a ambientes o que no futuro poderia gerar estrutura genética diferentes destas populações. A alta quantidade de alelos privados encontrados na pupunha (*Bactris gasipaes*) sugere uma relação com as altas taxas de mutação deste marcador (Cole *et al.*, 2007).

As Heterozigiosidade esperadas (H_e) foram altas para a maioria dos loci EST-SSR, variando de 0,691 (lôcus MDI004) a 0,903 (lôcus MDI009), com uma média de 0,794, indicando uma probabilidade de 79,4% de detectar 2 alelos diferentes nos acessos do banco de germoplasma. Utilizando SSR em goiaba (*P. guaiava*) este valor de 0,43 foi considerado alto (Sanabria *et al.*, 2006), em *Calothamus quadrifidus*, a H_e foi similar ao camu-camu com valores entre 0,51 e 0,93, e em eucalipto a média foi um pouco maior com 0,86 (Elliott y Byrne, 2005; Kirst *et al.*, 2004).

Os valores de heterozigiosidade observada (H_o) variaram de 0,26 a 0,53, sendo inferiores a H_e em todos os loci, indicando deficiência de heterozigotos (Tabela 1). Todos os loci apresentaram coeficientes de endogamia (f) altos, variando de 0,32 (MDI004) a 0,66 (MDI006), sendo significativamente diferentes de zero ($P \leq 0,01$) e indicando deficiência de heterozigotos, como demonstrado pelos valores de H_o . Na pupunha índices de endogamia altos 0,50 são explicados pela significativa endogamia biparental detectada e pela seleção humana, dado a abundância de parentes em uma área pequena e ainda pela prática de plantar meio irmãos nas roças (Rodrigues, 2007). É de ressaltar que pelo fato de loci microssatélites sofrerem altas taxas de mutação, os valores de f podem estar superestimados. Assim em amostras pequenas é quase impossível coletar todos os possíveis genótipos de cada um dos loci resultando nesta super-estimação (Collevatti *et al.*, 2001). Em outros casos estes altos valores podem ser explicados pela presença de alelos nulos, e de uma sub-estruturação reprodutiva da população (efeito «Wahlund») (Nei, 1978), ou também pode ser atribuído a um sistema parcial de autofecundação (Rossetto *et al.*, 1999).

Neste caso, os altos valores de endogamia encontrados, descartando-se a presença de alelos nulos nas populações, podem ser devido a duas causas: a) que os loci EST-SSR estejam relacionados com genes expostos a pressão de seleção natural ou humana; b) que os acessos sejam produto de cruzamento entre indivíduos aparentados. Esta última pode ter ocorrido nas populações onde, por condições difíceis de coleta, foram selecionadas sementes de árvores próximas. Epperson y Chung (2001) verificaram em *Pinus strobus* (Pinaceae), que o fluxo gênico entre indivíduos dentro das populações enquadra-se no modelo de isolamento por distância, a espécie possui restrito fluxo gênico

Tabela 3. Classificação do numero de alelos de acordo com sua freqüência e distribuição entre os 139 acessos de populações de camu-camu mantidos no banco ativo de germoplasma BAG pelo INPA com oito loci microssatélites.

	Comum (> 0,05)	Raro (<0,05)	Numero total
Privado	16	7	23
Esporádico	46	0	46
Difundidos	34	0	34
Total	96	7	103

Tabela 4. Estimativa com oito *loci* microssatélites de camu-camu em banco ativo de germoplasma (BAG) pelo INPA.

	Populações	N	At	Ai	P	H _e	H _o	f
1	Candeias	17	42	2,10	2	0,59	0,18	0,69
2	Caume	13	54	2,62		0,60	0,27	0,56
3	Iquitos	6	24	4,00		0,48	0,35	0,28
4	Javari	5	27	5,39	1	0,63	0,52	0,19
5	Jaru	5	16	3,20		0,30	0,15	0,53
6	Machado	6	34	5,67	2	0,66	0,37	0,45
7	Urupá	4	35	8,74	1	0,79	0,59	0,28
8	Jamari	4	21	5,24	2	0,51	0,4	0,24
9	Madeira	5	35	6,99	1	0,69	0,47	0,34
10	Marabá	6	44	7,33	4	0,83	0,68	0,18
11	Acari	5	34	6,80		0,76	0,65	0,16
12	Pirara	5	21	4,19		0,51	0,40	0,24
13	Pirarucu	3	18	6,00		0,47	0,41	0,15
14	Taruma	5	38	7,60	2	0,77	0,62	0,21
15	Trombetas	4	26	6,50		0,72	0,56	0,24
16	Uatuman	35	64	1,86	6	0,77	0,51	0,33
17	Urubu	11	24	2,00	2	0,35	0,18	0,50
					23	0,61	0,43	0,32

N - número acessos por população; At- Número de alelos totais na população; Ai - Número de alelos por acesso; P- Número de alelos privados; H_e- Heterozigosidade esperada; H_o Heterozigosidade observada; f- índice de fixação.

e a estrutura espacial sugere ser decorrente da depressão por endogamia devido a cruzamentos biparentais entre indivíduos mais próximos. Este fato pode estar acontecendo nas populações naturais de camu-camu nos diferentes rios onde foram feitas as coletas, visto que estas são áreas isoladas geograficamente.

Variação entre e dentro das populações

Com exceção de Iquitos, Jamari e Urubu que apresentaram 87,5% de *loci* polimórficos, todos os *loci* foram polimórficos. O número de alelos para todos os *loci* variou entre as populações sendo maior em Uatuman com 64 alelos e menor em Jaru com 16 (Tabela 4). O número de alelos por acesso (Ai) foi maior para as populações Urupá e Marabá, com 8,74 e 7,33 alelos (Tabela 4). A riqueza alélica destas populações é importante na conservação, onde é possível manter uma maior diversidade com poucas plantas que tenham a maior quantidade de alelos possíveis. As populações de Uatuman e Candeias, que têm o maior número de acessos, tiveram o menor número de alelos por acesso 1,86 e 2,10 respectivamente.

A Heterozigosidade esperada para as populações teve média de 0,61, sendo maior em Marabá e Urupá, e menor em Jaru e Urubu, possivelmente devido a pouca quantidade de alelos encontrada nestas últimas populações (Tabela 4). Os valores aqui encontrados foram menores que os observados com SSR em acessos de Myrtaceas como *Melaleuca* sp., *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*, onde foram detectados valores acima de 0,7 (Rossetto *et al.*, 1999; Brondani *et*

al., 1998). Isto pode ser explicado pelo maior polimorfismo detectado nos *loci* SSR e uma amostragem usada nesses estudos.

As heterozigosidades observadas foram maiores nas populações de Marabá e Acari e menor para Urubu, Candeias e Jaru (Tabela 4), sendo em todas as populações inferiores a H_e.

Em outras Myrtaceas como *Melaleuca* sp., também foi encontrado que das populações analisadas 85% apresentaram menor valor de H_o (Rossetto *et al.*, 1999). Em eucalipto esta reduzida H_o comparada com H_e pode ser devido a uma forma parcial de autopolinização descrita para esta espécie (Brondani *et al.*, 1998).

Os coeficientes de endogamia (f) foram significativamente diferentes de zero e variaram entre as populações, sendo maior em Candeias e menor em Pirarucu (Tabela 4), demonstrando deficiência de heterozigotos. Estes valores altos de endogamia podem ser devido a problemas descritos anteriormente nos *loci*, relacionados com a coleta dos acessos de árvores muito próximas e o cruzamento restrito à poucos indivíduos em algumas populações pequenas e isoladas geograficamente.

A análise da variância molecular (AMOVA) detectou que 80,3% do total da variação foi encontrada dentro das populações e 19,7 % entre as populações, com valores significativos (P≤0,001). A proporção entre as populações é similar às estimativas de F_{ST} (0,21) e G_{ST} (0,308) demonstrando a

estrutura genética entre as populações. Esta proporção de variabilidade dentro dos acessos foi similar a outras Myrtaceas como na *Melaleuca* com 93%, *Eugenia uniflora* com 78,9% e goiaba 64,5% (Rossetto *et al.*, 1999; Salgueiro *et al.*, 2004; Sanabria *et al.*, 2006).

A divergência genética (F_{ST}) estimada pelas frequências alélicas entre as 17 populações foi 0,21 (Tabela 1), valor considerado alto entre 0,15 e 0,25 (IPGRI y Cornell University, 2004). Os valores altos de F_{ST} dos *loci* MDI0013 e MDI0015 (0,3 e 0,24) indicam que esses *loci* podem ser úteis para discriminar populações de camu-camu de diferentes regiões geográficas. Esta diferenciação genética calculada foi também alta com as estimativas de $G_{ST} = 0,308$. Algumas das divergências genéticas nos casos de microsatélites incorporam o processo mutacional, assumindo que a diferença entre o número de repetições de dois SSR é proporcional ao momento de divergência de um ancestral comum. Essa distância "stepwise" medida pelo (R_{ST}) foi 0,285 ($P=0,000$) e o valor de número de migrantes (Nm) foi 0,624. Em *E. dysenterica* se relata um alto valor encontrado da estimativa de F_{ST} (0,25) e um baixo fluxo gênico ($Nm = 0,75$), o que sugere que este fluxo é restrito a uma área e não tem sido suficiente para contrapor os efeitos da deriva genética nessa espécie (Zuchi *et al.*, 2004). Em cupuçu foi encontrado um valor alto F_{ST} (0,36), decorrente com os processos de diferenciação das populações naturais ali estudadas (Alves, 2002). Em *Eugenia uniflora* e outras arbóreas existe uma alta variação entre populações, isso se explica em alguns casos pela limitada dispersão do pólen e sementes (Salgueiro *et al.*, 2004). No caso de camu-camu os frutos podem ser transportados pelos rios e por peixes, mas ainda não é conhecido este sistema de dispersão de semente entre estas populações; portanto, o isolamento

por distância das populações de camu-camu incluídas no BAG dificulta a movimentação dos dispersores de pólen e sementes, o que pode provocar a deriva ou perda de alelos e a redução do fluxo gênico entre estas populações.

O índice de fixação para a espécie como um todo (F_{IT}) foi 0,502 (Tabela 1), ou seja, existe uma probabilidade de 50,2% de que um dos alelos de um indivíduo do BAG sejam iguais. Este valor de F_{IT} varia entre 0,349 e 0,678, indicando uma taxa variável de endogamia da espécie em todas as populações estudadas. O índice de fixação dos acessos dentro de cada uma das 17 populações (F_{IS}) foi 0,377 (Tabela 3), o que está relacionado com o excesso de homozigotos, ou seja, 37,4% dos cruzamentos dentro das populações podem ser endogâmicos possivelmente por cruzamentos entre parentes dentro de cada população.

Relação genética entre acessos

As distâncias genéticas D de Nei 1978 variaram de 0,02 a 2,78. A menor distância foi entre as populações Machado com Urupá (0,02). As maiores distâncias foram entre a população Jarú com as populações Pirarucu, Urubu e Tarumã (2,78; 2,61 e 2,05). Na goiaba as distâncias D entre acessos foram menor que as de camu-camu com variações mínimo 0,071 e máximo 0,291 (Sanabria *et al.*, 2006) devido a pequena distância das áreas de coleta dos acessos desta espécie. As populações com maiores distâncias foram as coletados em Rondônia com aqueles de Amazonas e Roraima. Portanto essas populações contêm acessos que podem ser usados como progenitores em cruzamentos que garantissem maior variabilidade e ganho genético; estes dados servirão para monitorar os cruzamentos e ajudar as atividades de melhoramento da espécie.

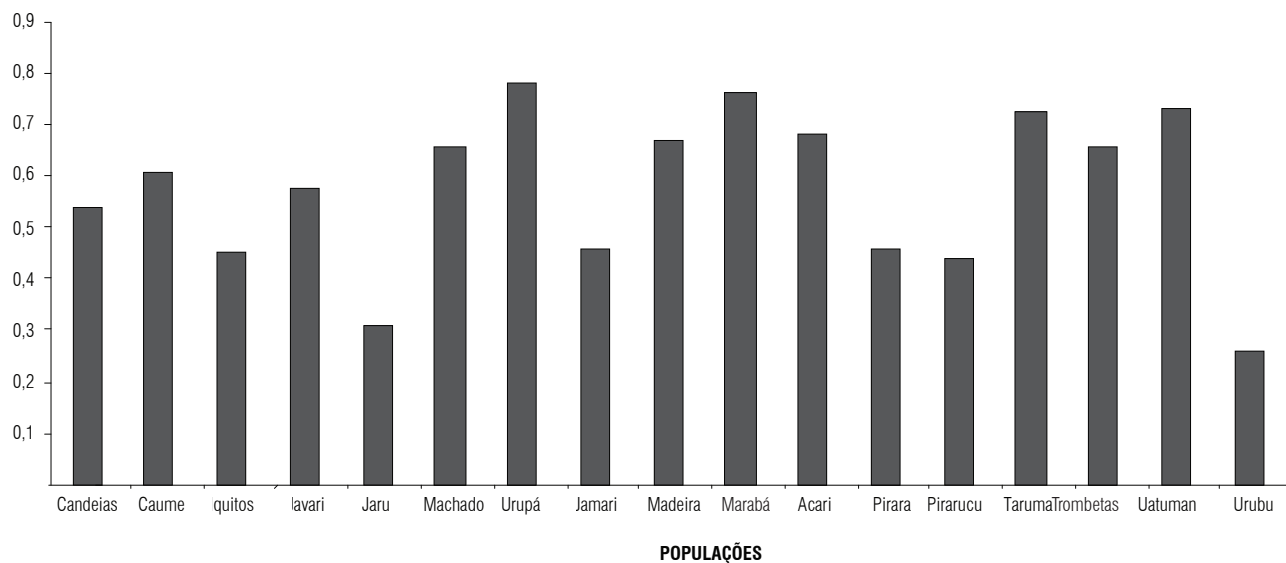


Figura 3. Média da distância de alelos compartilhados (D_{as}) dos oito *loci* microsatélites dentro de cada uma das 17 populações do BAG de camu-camu, INPA.

Nas distâncias de alelos compartilhados (D_{AS}) medidas dentro de cada população tiveram variações entre 0,261 e 0,781, para Urubu e Urupá, respectivamente (Figura 3). No caso das populações de Urubu (0,261) e Jaru (0,30) esta distância menor significa que dentro de estas populações os acessos compartilham um maior número de alelos, indicando um maior grau de parentesco entre as mesmas. Em pupunha estes valores foram em algumas populações de 0,03 indicando alto relacionamento genético entre as elas (Rodrigues, 2007).

O dendrograma multi-loci das distâncias (D) de Nei (1978) entre as populações (Figura 4) demonstra a formação de 2 grupos principais e 5 subgrupos, os quais correspondem na maioria dos casos às áreas geográficas de coleta dos acessos.

GRUPO I, Rondônia, Fronteira Peru-Brasil, Pará, Amazonas Oriental que corresponde aos seguintes subgrupos: Subgrupo I populações de Rondônia: Machado, Jaru e Urupá, as quais são provenientes de populações em rios próximos (100 km) no sudeste de Porto Velho, e Candeias

e Jamari de rios próximos (<100 km) que desembocam no rio Madeira. Subgrupo II são populações do rio Madeira e dos rios do Oriente do Amazonas e Ocidente de Pará, Uatuman e Trombetas. Subgrupo III, o qual é geograficamente disperso porque inclui a população Marabá coletados no Pará, e as populações da fronteira de Brasil-Peru, Javari e Iquitos.

GRUPO II, Roraima e Amazonas Ocidental, que corresponde aos seguintes subgrupos: Subgrupo IV populações de Roraima, Cauamé e Urubu e uma população da parte ocidental do Amazonas Pirara. Subgrupo V das populações perto de Manaus, Tarumã, Acari e Pirarucu.

Estes grupos formados no dendrograma multi-loci mostram a população de Marabá junto à populações distantes geograficamente, de Iquitos no Peru e Javari na Fronteira de Peru e Brasil, esta maior similaridade não é facilmente explicada, mas poderia se: a) os acessos de Marabá fossem provenientes de populações não naturais, que foram plantadas de sementes trazidas de Peru, mas os dados do BAG se referem a populações naturais; b) as populações se

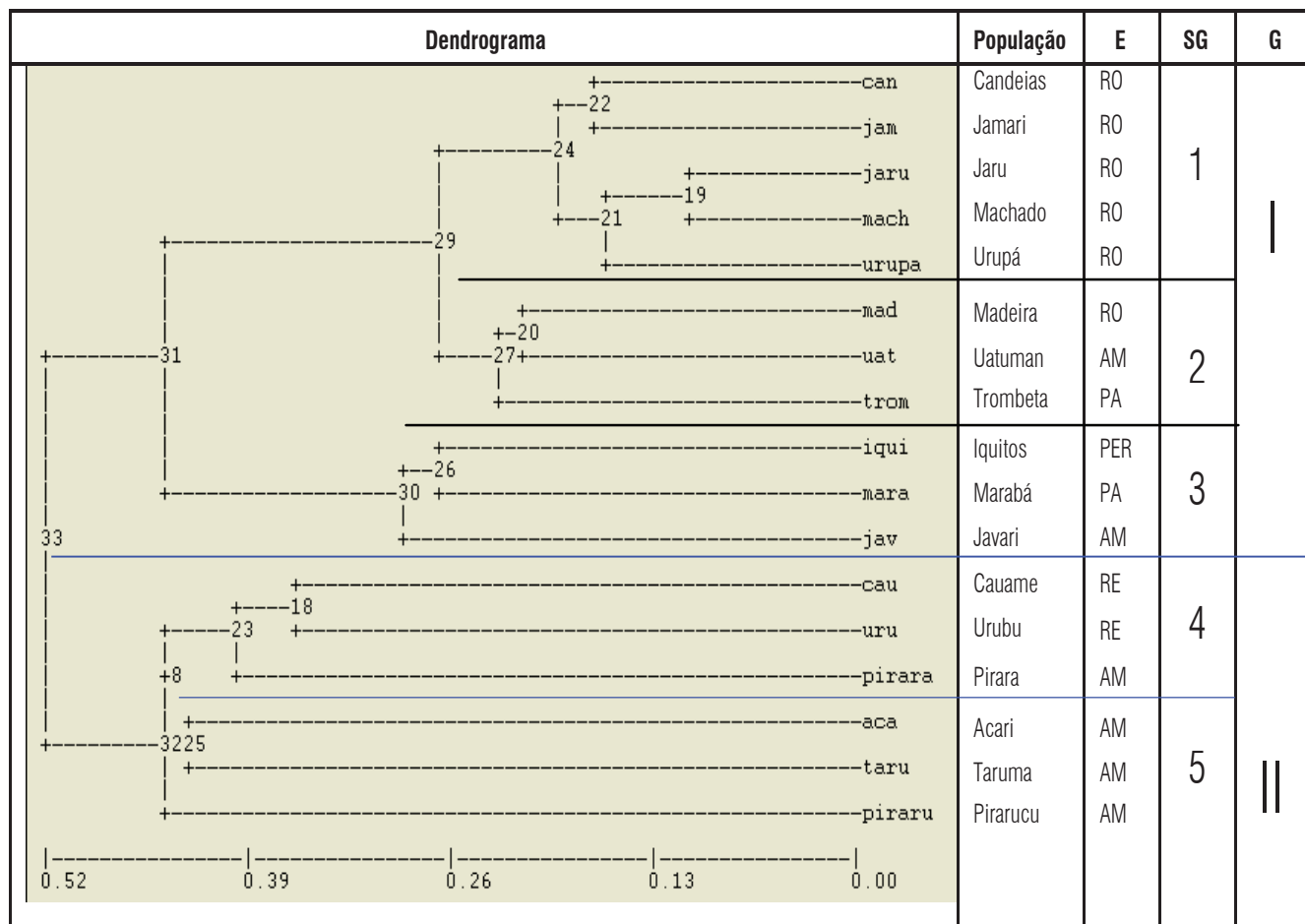


Figura 4. Dendrograma multi-loci, baseado na distância (D) (Nei, 1978) e ordenados por UPGMA, mostrando as relações genéticas entre as 17 populações de camu-camu do BAG do INPA. E- Estado de origem das coletas; SG - subgrupos e G - grupos

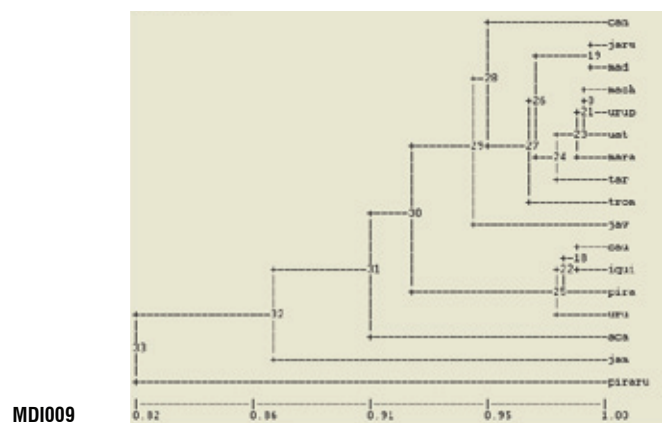
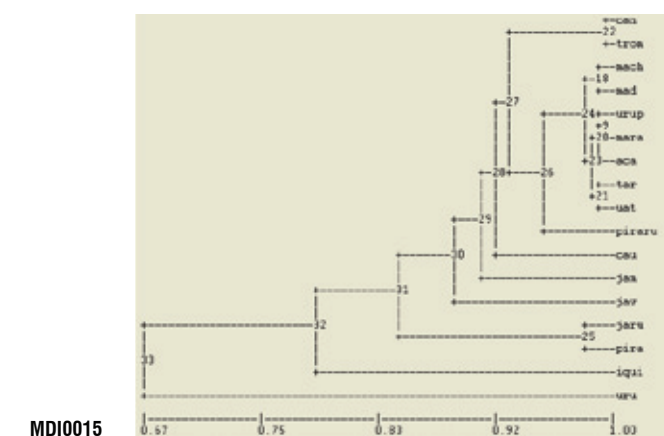
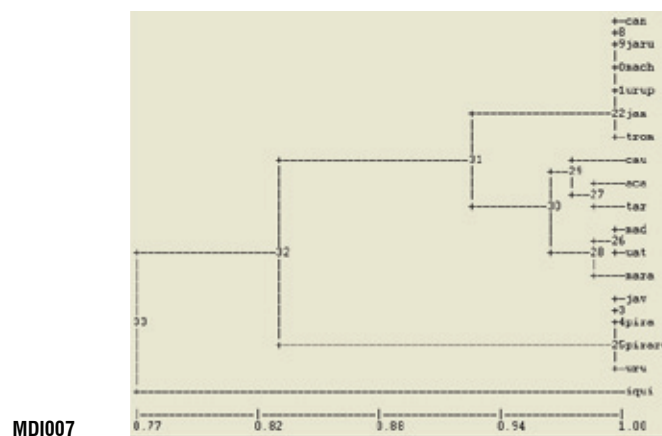
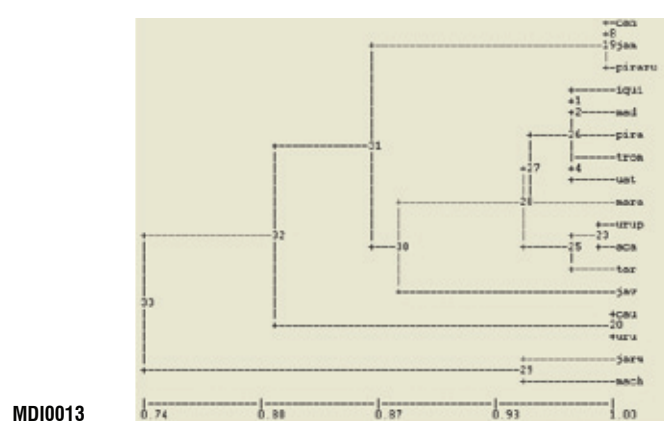
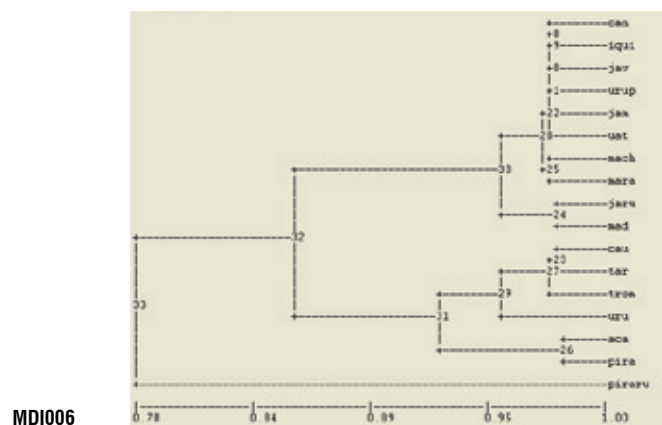
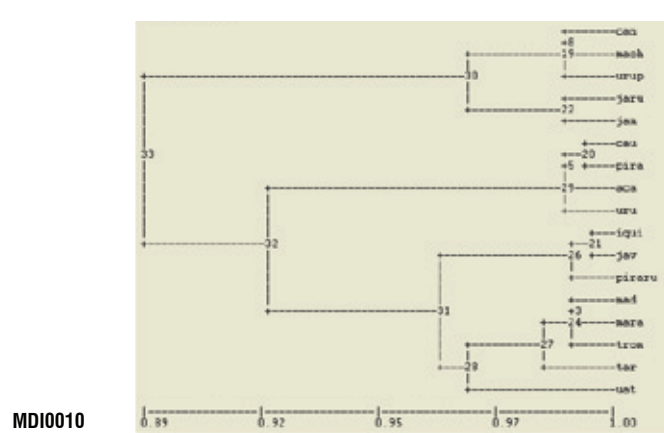
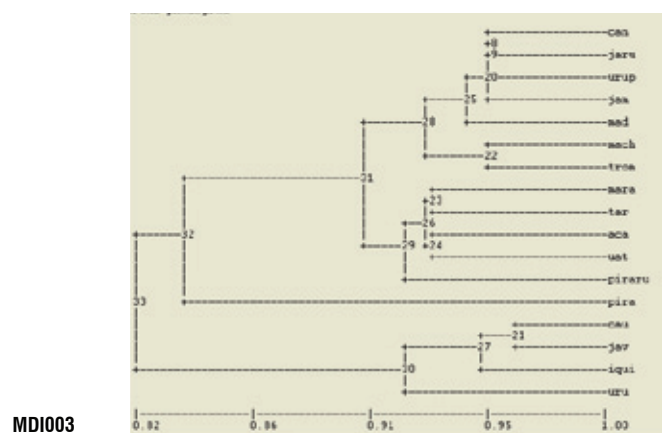


Figura 5. Dendrograma de cada locus, baseados nas distâncias (D) (Nei 1978) e ordenados por UPGMA, mostrando as relações genéticas entre as 17 populações de camu-camu do BAG do INPA

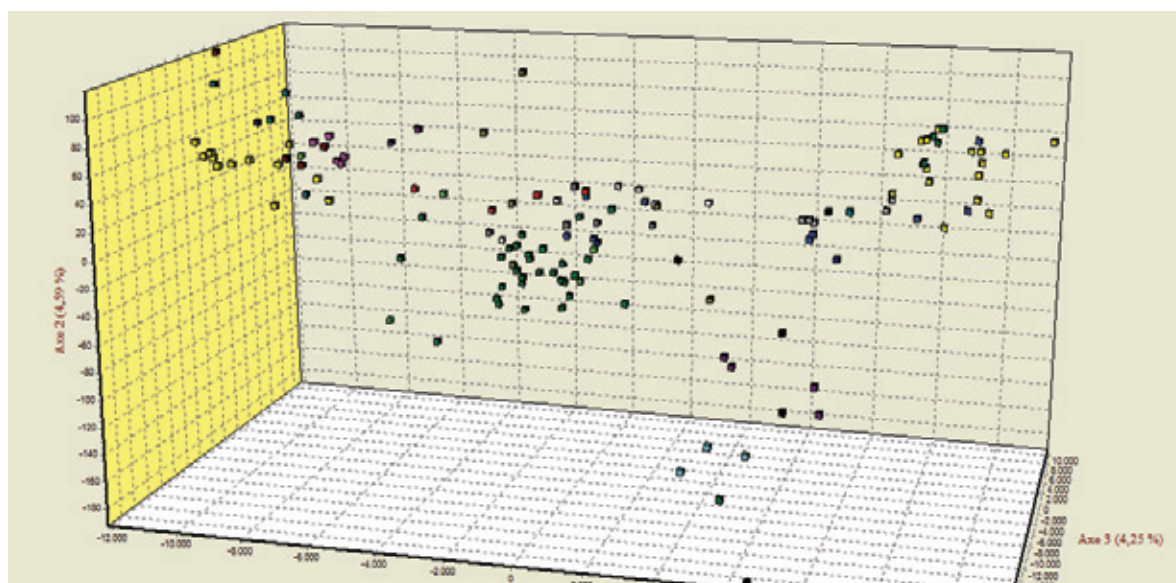


Figura 6. Análise fatorial de correspondência (FAC), dispersão dos 139 acessos ordenados (igual cor) nas 17 populações de camu-camu presentes no BAG do INPA

originaram ou se enriqueceram com sementes transportadas por peixes que migram amplas distâncias nos rios; c) e ainda pela ocorrência de erros na coleta ou no momento que foram plantados no BAG. Esta última explicação poderia ser comprovada com uma nova genotipagem de amostras de folhas oriundas de uma nova coleta nesta população.

Observando-se o efeito de cada *loci* na distância entre populações, os dendrogramas baseados em UPGMA (Figura 5) demonstraram em sua maioria que Marabá esteve geneticamente menos distante de populações próximas geograficamente, como Uatumã, Madeira e Trombetas e em outros com populações do grupo de Rondônia; em nenhum dos dendrogramas foi encontrada uma proximidade com as populações de Iquitos e Javari, como as encontradas no dendrograma multi-*loci*. Nestas análises, a população de Candeias mostrou-se distante das populações dos estados do Pará, Roraima e Amazonas, como observado pelo dendrograma multi-*loci*, e no locus MDI006 agrupou-se as populações de Iquitos e Javari. Para Uatumã observou-se diferentes agrupamentos em cada *locus*, desde próximos aos grupos de Rondônia, e distantes de todas as populações como no locus MDI0010. A população Pirarucu que foi a mais distante das populações de Rondônia no dendrograma multi-*loci*, foi só próxima à população Candeias no locus MDI0013 (Figura 5).

De acordo com os resultados de correlação entre distâncias genéticas e distâncias geográficas entre os acessos das populações, nas medidas pela trajetória dos rios, a correlação foi de 0,33 $R^2 = 0,11$ e nas medidas pelas distâncias retas terrestres a correlação foi de 0,39 $R^2 = 15,4 \%$, estas correla-

ções foram influenciadas possivelmente por aqueles casos nos quais acessos da mesma população estavam dispersos como o caso de Candeias e Urubu (Figura 6) e também por populações com amplas distâncias geográficas que demonstraram pequenas distâncias genéticas como Iquitos e Marabá. Na espécie *Eugenia dysenterica* a correlação matricial entre as distâncias genéticas e geográficas foi elevada ($r=0,871$ e $P=0,002$), o que indica que conforme aumenta a distância entre os indivíduos, às distâncias genéticas se tornam maiores, o que pode ser relacionado com um padrão espacial da variabilidade genética (Zucchi *et al.*, 2004).

Na *E. uniflora* também foi encontrada uma relação entre estas distâncias genéticas e geográficas com algumas exceções, onde acessos com distâncias genéticas menores estavam distantes geograficamente (Salgueiro *et al.*, 2004). No caso de camu-camu, as distâncias pelos rios poderiam influenciar esta correlação se existisse um fluxo gênico pelas sementes, pelos ribeirinhos ou por animais como peixes, mais ainda são pouco conhecidos estes mecanismos de dispersão. Os resultados do teste de Mantel em espécies como *Piper nigra* e *E. grandis*, onde não existe uma correlação significativa, sugerem uma distribuição da diversidade não consistente com uma estrutura geográfica porque as barreiras naturais como montanhas e rios podem separar as populações. As populações nos rios Loire e Rhone na França, que estão próximos mais separados por montanhas, causa um isolamento por barreiras geográficas (Storme *et al.*, 2004). Em alguns casos as correlações geográfica e genética, podem ser inexatas se as populações foram formadas ou enriquecidas a partir de materiais originados em outros lugares (Hayati *et al.*, 2004).

CONCLUSÃO

- O presente estudo amostra a utilidade dos marcadores EST-SSR na detecção de polimorfismo entre acessos e populações do banco de germoplasma de camu-camu.
- Ainda ser menos polimórficos os marcadores EST-SSR apresentaram um alto possivelmente por ser o camu-camu uma espécie não domesticada.
- As análises de AMOVA e as estimativas de F_{ST} indicam uma estrutura genética entre populações polimórficas devido possivelmente. Os altos níveis detectados de variabilidade entre as populações amostram que existem diferenças devidas ao isolamento geográfico, que causa cruzamento entre parentes, deriva genética e baixo fluxo gênico. Estas variações entre populações e altos índices de endogamia podem ser também causados por problemas na coleta.
- Baseados nas distâncias genéticas foram encontrados dois grupos principais e cinco subgrupos os quais estão relacionados com os lugares de coleta.
- Não foi encontrada correlação entre Distância genética e geográfica devido possivelmente à dispersão de alguns dos acessos das populações do BAG.

AGRADECIMENTOS

À Suframa, CNPq, Fapeam pelos recursos financeiros e a estrutura para o avanço desta pesquisa. À INPA, pelo fornecimento de material vegetal do banco de germoplasma de camu-camu, À LGV (Laboratório de Genética Vegetal), o LCTV (Laboratório de Cultura de Tecidos) e os laboratórios do bloco multidisciplinar de Biotecnologia da UFAM pelo uso de equipamentos de laboratório para os processos de uso dos marcadores em camu camu.

REFERÊNCIAS

- Alves RM. 2002. Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng) Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânico-agronômicos [Tese doutorado]. Piracicaba, Brasil: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ). 146 p.
- Brondani RPV, Tarchini R, Grattapaglia D. 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theor Appl Gen* 97:816-827.
- Caliri GJA. 2002. Estudos fenológicos e seleção de matrizes em quatro procedências de camu-camu silvestre (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) da região Amazônica, para uso em sistemas agroflorestais [Dissertação de mestrado]. Manaus, Brasil: UFAM-INPA. Brasil. 60 p.
- Cedecam. 2007. Camu camu. Información general. En: http://www.cedecam.org/camucamu_informacion.htm; consulta: junio 2011.
- Cole DM, White TL, Nair PKR. 2007. Maintaining genetic resources of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth): The role of seed migration and swidden-fallow management in northeastern Peru. *Gen Resour Crop Evol* 54:189-204.
- Collevatti RG, Grattapaglia D, Hay JD. 2001. Population genetic structure of endangered tropical trees species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Mol Ecol* 10:349-356.
- Chakraborty R, Jin L. 1993. A unified approach to study hypervariable polymorphisms: Statistical considerations of determining relatedness and population distances. En: Pena SDJ, Chakraborty R, Epplen JT, Jeffreys AJ, editores. *DNA fingerprinting: State of the science*. Basel, Suíça: Birkhauser Verlag. pp. 21-28.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Focus* 12(1):13-15.
- Elliott CP, Byrne M. 2005. Isolation and characterization of microsatellites in the woody shrub, *Calothamnus quadrifidus* (Myrtaceae). *Mol Ecol Notes* 5:757-759.
- Epperson BK, Chung MG. 2001. Spatial genetic structure of allozyme polymorphism within populations of *Pinus strobes* (Pinaceae). *Am J Bot* 88:1006-1010.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform* 1:47-50.
- Fraser LG, Harvey CF, Crowhurst RN, de Silva HN. 2003. EST-derived microsatellites from *Actinidia* species and their potential for mapping. *Theor Appl Gen* 108:1010-1016.
- Glaubitz JC. 2004. Convert: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Mol Ecol Notes* 4:309-310.
- Gonzalo MJ, Oliver M, Garcia-Mas J, Monfort A, Dolcet-Sanjuan R, Katzir N, Arús P, Monforte AJ. 2005. Simple-sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melo* L.). *Theor Appl Gen* 110(5):802-811.
- Goodman SJ. 1997. RSTCALC: a collection of computer programs for calculating unbiased estimates of genetic differentiation and determining their significance for microsatellite data. *Mol Ecol* 6:881-885.
- Hayati A, Wickneswari R, Maizura I, Rajanaidu N. 2004. Genetic diversity of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) germplasm collections from Africa: implications for improvement and conservation of genetic resources. *Theor Appl Gen* 108:1274-1284.
- Hu J, Nakatani M, Garcia LA, Fujimura T. 2004. New microsatellite markers developed from reported *Ipomoea trifida* sequences and their application to sweetpotato and its related wild species. *Scientia Hort* 102:375-386.
- IPGRI; Cornell University. 2004. Análisis de la diversidad genética utilizando datos de marcadores moleculares: Módulo de aprendizaje. En: http://www2.bioversityinternational.org/Publications/Molecular_Markers_Volume_2_es/PDF/III.%20Medida%20de%20la%20diversidad%20gen%C3%A9tica.pdf; consulta: julio de 2011.
- Kirst M, Cordeiro CM, Rezende GDSP, Grattapaglia D. 2004. Power of microsatellite markers for fingerprinting and parentage analysis in *Eucalyptus grandis* breeding populations. *J Hered* 96(2):161-166.
- Langella O. 2002. Population 1.2.28. Logiciel de génétique des populations. Gif-sur-Yvette, França: Laboratoire Populations, Génétique et Évolution, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).
- Lewis PO, Zaykin D. 1999. Genetic data analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d12). Distribuídos pelos autores.
- Marshall DK, Brown AHD. 1975. Optimum sampling strategies in genetic conservation. En: Frankel OH, Hawkes JGR, editores. *Crop genetic resources for today and tomorrow*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. pp. 53-70.
- 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.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Qureshi SN, Saha S, Kantety RV, Jenkins JN. 2004. EST-SSR: A new class of genetic markers in cotton. *J Cotton Sci* 8:112-123.
- Reddy OU, Pepper AE, Abdurakmonov I, Saha S, Jenkins JN, Brook T El-Zik KM. 2001. New dinucleotide and trinucleotide microsatellite marker resources for cotton genome research. *J Cotton Sci* 5:103-113.
- Risterucci M, Duval MF, Rohde W, Billotte N. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. *Mol Ecol Notes* 5:745-748.
- Rodrigues DP. 2007. Diversidade genética e sistema de reprodução em progênes elites de pupunheira inerme (*Bactris gasipaes* Kunth) com marcadores microssatélites: Implicações para o melhoramento do palmito [Tese doutorado]. Manaus, Brasil: Universidade Federal do Amazonas.
- Rojas S, Rodrigues D, Lima M, Philo SA. 2008. Desenvolvimento e mapeamento de microssatélites gênicos (EST-SSRs) de camu-camu (*Myrciaria dubia* [H.B.K.] McVaugh). *Rev Corpoica* 9(1):14-21.
- Rossetto M, Slade RW, Baverstock PR, Henry RJ, Lee LS. 1999. Microsatellite variation and assessment of genetic structure in tea tree *Melaleuca alternifolia* - Myrtaceae. *Mol Ecol* 8:633-643.
- Salgueiro F, Felix D, Caldas JF, Pinheiro MM, Margis R. 2004. Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. *Diversity and Distributions* 10:201-210.
- Sanabria HLO, García MA, Muñoz JE, Díaz HA. 2006. Caracterización molecular con marcadores RAM de árboles nativos *Psidium guajava* (guayaba) en el Valle del Cauca [Tese de Mestrado]. Palmira, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18:233-234.
- Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139:457-462.
- Storme V, Broeck A, Ivens B, Halfmaerten D, Van Slycken J, Castiglione S, Grassi F, Fossati T, Cottell JE, Tabbener HE, et al. 2004. Ex situ conservation of black poplar in Europe: Genetic diversity in nine gene bank collections and their value for nature development. *Theor Appl Gen* 108:969-981.

- Teixeira AS, Chaves LS, Yuyama K. 2004. Esterases no exame da estrutura populacional de camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh-Myrtaceae). Acta Amazôn 34(1):89-96.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38:1358-1370.
- Woodhead M, Russell J, Squirrell J, Hollingsworth PM, Mackenzie K, Gibby M. 2005. Comparative analysis of population genetic structure in *Athyrium distentifolium* (Pteridophyta) using AFLPs and SSRs from anonymous and transcribed gene regions. Mol Ecol 14:1681-1695.
- Yuyama LKO, Aguiar JPL, Yuyama K, Lopes TM, Fávaro DIT, Bergl PCP, Vasconcelos MBA. 2003. Teores de elementos minerais em populações de camu-camu. Acta Amazôn 33(4):549-554.
- Zucchi MI, Pinheiro JB, Aguiar AV, Chaves L, Guedes J, Coelho AS, Vencovsky R. 2004. Padrão espacial de divergência em populações de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores microssatélites. Floresta e Ambiente 11(1):29-38.