



## RELATÓRIO TÉCNICO

Análise Genética das Populações de *Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh (camu-camu) e *Ceiba pentandra* L. (samaúma) ocorrentes na área de Influência da UHE Santo Antônio

**Março/2013**

**Fundação Universidade Federal de Rondônia  
Laboratório de Germoplasma – Genética Molecular Fisiologia Vegetal e  
Conservação**

Fundação Universidade Federal de Rondônia  
Laboratório de Germoplasma – Genética Molecular Fisiologia Vegetal e  
Conservação

## RELATÓRIO TÉCNICO

### **EQUIPE TÉCNICA**

*Coordenadores*

**Renita B. C. Frigeri**

Bióloga, doutora em Biologia Vegetal, professora da UNIR e coordenadora  
LABIFISIO

**Francisca de J. Holanda**

Bióloga, doutora em Genética Vegetal, professora da FIMCA e coordenadora  
LABGVEC

*Biólogos*

**Rudson de J. Holanda**

Doutorando em Biologia Molecular e Experimental/ UNIR

**Alessandro A. Pereira**

Doutorando Genética Vegetal/ESALQ

*Estagiária*

**Jeane N. Moraes**

**Sueli B. de Castro**

**Março/2013**

## 1. INTRODUÇÃO

Este estudo tem o objetivo de apresentar as análises de diversidade e divergência genética da população de *Myrciaria dubia* (camu-camu) a partir dos parâmetros da estatística  $F$  de Wright (1951), que corresponde ao índice de fixação de uma população e das estatísticas descritivas que são alguns dos descritores que auxiliam na caracterização genética de uma população de acordo com os seguintes parâmetros: heterozigosidade ( $H_o$  e  $H_e$ ), coeficiente de fixação/endogamia( $f$ ), riqueza alélica, entre outras.

Cumprindo assim, a proposta do PBA delineado no projeto intitulado *Análise Genética das Populações de Myrciaria dubia (camu-camu) e Ceiba pentandra (samaúma) ocorrentes na Área de Influência da UHE Santo Antônio*.

## 2. OBJETIVOS

- a) Verificar a diversidade genética da população de plantas de camu-camu, coletadas às margens do rio Madeira, utilizando-se marcadores microssatélites associados à região expressa do genoma (EST-SSRs)
- b) Analisar a divergência genética da população de *M. dubia* na área de influência da UHE Santo Antonio.

## 3. MATERIAL E MÉTODO

### 3.1 Caracterização das populações de *Myrciaria dubia*

As análises de diversidade e divergência genética foram realizadas com três populações de *M. dubia* (camu-camu), uma coletada ao longo do rio Madeira, acima da cachoeira de Santo Antonio, pela bióloga da Santo Antonio (população de interesse deste estudo), identificada como camu-camu/SAE. A segunda população foi coletada ao longo do rio Madeira, abaixo da cachoeira de Santo Antônio, sentido distrito de Calama/RO, identificada como madeira e a terceira população foi coletada de acessos do rio Jamari, nas proximidades

da cidade de Monte Negro/RO, população identificada como montenegro. Essas duas últimas fazem parte da DNAteca dos laboratórios do Banco de Germoplasma/UNIR.

### 3.2 Amplificação dos locos microssatélites e detecção do polimorfismo

Para as análises de diversidade e estrutura genética da população de camu-camu/SAE foram genotipadas 30 amostras com seis locos de marcadores nucleares tipo EST-SSR, desenvolvidos por Rojas Gonzalez (2007). Para as reações de genotipagem em sequenciador, foi ligada na extremidade 5' de cada *primers forward*, dos locos estudados, a sequência M13 (5' TGTAACGACGGCCAGT 3') e, uma outra sequência M13 correspondente, marcada com fluorocromo específico (6-FAM ou HEX), seguindo o protocolo segundo Schuelke (2000) com modificações. Para a amplificação dos fragmentos marcados foi realizada uma reação de PCR nas seguintes condições: tampão 10X (TrisHCl 100 mM, KCl 500 mM, pH 8.4), dNTP a 2,5 µM, MgCl<sub>2</sub> a 25 mM, *primer Forward* M13 a 5 µM, *primer Forward* M13 marcado com fluorocromo Hex a 5 µM, *primer Reverse* a 5 µM, 1,5 U *Taq* DNA Polimerase (Prodinol 5 U/µL) e DNA a 15 ng/µL para um volume final de 10 µL. O programa de ciclagem correspondeu a um ciclo de 94 °C por dois minutos, seguido de 25 ciclos de 94 °C por 10s, temperatura de anelamento de cada *primer* T<sub>a</sub> por 20s, e 72 °C por 30s, em seguida um ciclo de 72 °C por 10 minutos, seguido de 20 ciclos de 94 °C por 10s, 50 °C por 10s, e 72 °C por 30s e uma extensão a 72 °C por 30 min. As amplificações foram realizadas em termociclador *Verite Thermal Cycler* (AB Applied Biosystems). A genotipagem dos produtos de PCR gerados foi realizada em sequenciador automático ABI (ABI Applied Biosystems) na UFAM. A análise dos tamanhos dos fragmentos foi realizada utilizando-se o programa *Fragment Profiler* (GE Healthcare, England), considerando o marcador de peso molecular ET-400-ROX.

### 3.2 Análise genética dos dados

Com os resultados obtidos dos seis locos analisados foi construída uma matriz com os genótipos de cada amostra de camu-camu e seus respectivos locos. Para estimação dos dados das frequências e riqueza alélicas foi utilizado o programa GenAIEx v.6.4 (PEAKALL & SMOUSE, 2006) com o GDA (LEWIS *et al.*, 1999), foram estimadas as Heterozigosidades e plotado o dendrograma de distância genética entre as populações. A análise hierárquica da Variância Molecular (AMOVA) foi estimada com o programa Arlequin v.3.01 (EXCOFFIER *et al.*, 2005), as distâncias genéticas de Nei (1978) com o programa MSA 4.05 (*Microsatellite Analyser*) (DIERINGER & SCHLÖTTERER, 2003). Para estimar a divergência genética das populações, estatísticas  $F$  (Wright, 1951), foi utilizado o programa FSTAT versão 2.9.3 (GOUDET, 2002).

A estatística  $F$  de Wright (1965) estima o coeficiente de endogamia e os parâmetros relacionados a pares de gametas, em uma população natural hierarquicamente subdividida, tendo os seguintes parâmetros:

- $F_{IT}$  - expressa a correlação entre os gametas que se unem para produzir os indivíduos em relação aos gametas da população total;
- $F_{IS}$  - expressa a média das correlações, sendo cada uma delas proveniente dos gametas que se unem em cada subpopulação em relação aos gametas desta subpopulação e;
- $F_{ST}$  - expressa a correlação entre os gametas ao acaso dentro da subpopulação em relação aos gametas da população total.

Obedecendo a seguinte equação:  $1 - F_{IT} = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$

As estimativas das heterozigosidades são as bases para determinar a diversidade genética de uma população e resume-se na medida geral da variação por loco em uma população. Os parâmetros como: número de alelos por locos, porcentagem de locos polimórficos, heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) sob equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e o índice de fixação ( $f$ ) são estimativas que caracterizam e comparam os níveis de diversidade genética. Além disso, o índice de fixação ( $f$ ) está sendo utilizado amplamente

como uma medida de desvios de panmixia do equilíbrio de Hardy-Weinberg (ZUCCHI, 2002; RODRIGUES, 2007).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1 Estimativa de diversidade gênica

Dos seis locos EST-SSRs (*Expressed Sequences Tags* ou sequências expressas) analisados, nas três populações, foram obtidos um total de 35 alelos, sendo que na população de interesse (camu-camu/SAE, Santo Antônio Energia) foram encontrados 34 alelos. A média de alelos por locos foi de 5,5. Foi observado polimorfismo em todos os locos, que variaram entre 4 a 7, para os locos MDI04 e MDI015, respectivamente. Esses dados corroboram com os resultados apresentados no estudo de Rojas Gonzalez (2007), que analisou 17 populações de camu-camu do Banco Ativo de Germoplasma do INPA, sendo 139 acessos de diferentes rios da bacia Amazônica, e obteve um total de 102 alelos, utilizando oito locos de EST-SSR. Dos cinco acessos do rio Madeira o pesquisador descreve um total de 35 alelos, sendo que a riqueza alélica média estimada foi de 6,99 alelos por acesso. Koshikene (2009) também estimou a diversidade genética dos acessos do BAG/INPA. Neste caso, foram estimados os dados de dois acessos do rio Madeira, com sete locos de marcadores microssatélites SSR (*Simple Sequence Repeats*), no qual, obteve-se um total de 12 alelos e a riqueza alélica estimada foi de 6 alelos por acesso. No presente estudo, a média da riqueza alélica foi de 3.04 por acesso. Rojas Gonzalez (2007) e Koshikene (2009) obtiveram, na fração amostral com maior número de acessos analisados menores índices de riqueza alélica. Entretanto, populações de Uatumã/AM (35) e Candeias/RO (17), estudadas por Rojas Gonzalez (2007) com maior número de acessos, apresentaram o menor número de riqueza alélica por acesso 1,86 e 2,1 respectivamente. Koshikene (2009) também descreve que para as populações com maiores quantidades de acessos foram as que apresentaram o menor número de alelos por acesso, sendo elas Candeias/RO (25) foi 1,6, para Uatumã/AM (41) foi de 1,8 e

Urubu/RR (39) foi 1,63 o que reforça os índices de riqueza alélica estimados para a população camu-camu/SAE.

Estes valores podem está relacionados com a coleta em áreas endêmicas, isto é, árvores próximas e cruzamento restrito a poucos indivíduos em algumas populações pequenas e isoladas.

Para a estimativa de alelos privados (exclusivos de uma só população) nos 30 acessos da fração amostral camu-camu/SAE, foram obtidos quatro alelos, no qual as frequências gênicas/alélicas variaram entre a menor do loco MDI10, igual a 0,019 e a maior do loco MDI15 igual a 0,116. Rojas Gonzalez (2007) encontrou um total de 23 alelos privados, destes, um foi encontrado nos acessos do rio Madeira. Koshikene (2009) estimou 43 alelos privados com marcadores SSR, entretanto em nenhum dos acessos do rio Madeira a mesma encontrou alelos privados. Os marcadores EST-SSRs, mesmo sendo de regiões mais conservadas, revelaram um número alto de alelos privados, porém com frequências baixas. Segundo Cole *et al.* (2007), os alelos privados devem está relacionados com algum grau evolutivo ou de adaptação ao ambiente. Nei (1987) considera fundamental a estimação da frequência de um alelo particular em uma população em estudos evolutivos, pois estes valores revelam as mudanças genéticas de uma população.

Portanto, os alelos privados estimados na população camu-camu/SAE, são representativos considerando o potencial genético, mesmo que um alelo tenha apresentado frequência baixa, para adaptação a mudanças do ambiente, porém deve ser considerada, também a erosão genética por ação antrópica ou por fatores estocásticos.

As heterozigosidades são consideradas medidas adequadas para quantificar a variação genética (Weir, 1996). Desta forma, a frequência de heterozigotos também é um importante indicador da diversidade genética, uma vez que cada heterozigoto carrega alelos diferentes, representando assim, melhor a diversidade presente na população (WEIR & BASTEN, 1990).

Em uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg, a estimativa de heterozigosidade observada é igual à proporção da heterozigosidade esperada (TORGGLER *et al.*, 1995)

As estimativas da heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) nos seis locos EST-SSRs, da população camu-camu/SAE, variaram entre 0,49 (loco MDI07) e 0,81 (loco MDI015). Os valores da heterozigosidade observada ( $H_o$ ) foram inferiores a  $H_e$  em todos os locos, variando entre 0,16 (loco MDI 013) e 0,70 (loco MDI 09), indicando carência de indivíduos heterozigotos. Os valores de  $H_o$  foram significativamente diferentes do esperado sob o Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p=0,05$ , após correção de Bonferroni) para todos os locos. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Rojas Gonzalez (2007), que detectou altos valores de  $H_e$ , que variou entre 0,69 (MDI04) e 0,90 (MDI09) com estimativas de  $H_o$  inferiores, em todos os locos (variando 0,26 a 0,53). No estudo de Koshikene (2009) com camu-camu do BAG e marcadores SSRs, verificou-se a mesma proporção nas estimativas da  $H_e$  e  $H_o$  de acordo com os resultados do presente estudo bem como de Rojas Gonzalez (2007), reforçando a carência de indivíduos heterozigotos nas populações de camu-camu estudadas. Considerando essas estimativas, observou-se altos valores do coeficiente de endogamia ( $f$ ), com média de 0,44 variando de 0,12 (loco MDI09) a 0,79 (loco MDI013), sendo todos os valores significativamente diferente de zero ( $p=0,05$ ). Rojas Gonzalez (2007) também encontrou altos valores de coeficiente de endogamia em todos os locos, nas populações de camu-camu, variando de 0,32 (MDI04) a 0,66 (MDI06). Resultados similares foram encontrados no estudo de Koshikene (2009), nem no presente estudo. Os altos valores do coeficiente de endogamia obtidos nas populações de camu-camu podem ser explicados considerando-se: i) a coleta dos acessos de plantas muito próximas e; ii) o cruzamento restrito a poucos indivíduos em algumas populações pequenas e isoladas geograficamente (ROJAS GONZALEZ, 2007).

As estatísticas descritivas em estudos de populações são relevantes, pois revelam a principio, o polimorfismo genético de uma população. Parâmetros como: número de alelos por locos ou total, de alelos efetivos, raros, exclusivos, heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ), coeficiente de endogamia( $f$ ), riqueza alélica, entre outras, são alguns dos descritores que auxiliam na caracterização genética de uma população (SÁNCHEZ, 2008).



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 frequências gênicas e genotípicas (Nei, 1987).

Então, o conhecimento da diversidade genética é primordial para a compreensão da dinâmica evolutiva das populações, sendo o fator fundamental para a adaptação às mudanças ambientais e evolutivas das espécies. Frankham *et al.*, (2008), também sugerem que a variabilidade genética pode ser considerada a “matéria prima” sobre a qual a seleção natural atua, fazendo com que o organismo recorra ao seu patrimônio genético, sempre que precisar adaptar-se às mudanças do ambiente.

#### 4.2. Relação das Distâncias Genéticas

As estimativas das distâncias genéticas foram realizadas segundo Nei (1978), entre três as populações; duas do rio Madeira (pop. 1- camu-camu/SAE; pop. 2- madeira) e a terceira coletada no rio Jamari (pop. 3- montenegro), com 1.000 reamostragem. O dendrograma plotado, entre as populações (fig.1), adotou o método UPGMA com IC de 95%. A distância genética estimada entre as duas populações do rio Madeira foi de aproximadamente 0,05 de dissimilaridade, representando o nó 4 (fig. 1) e entre as populações do rio Madeira e Jamari a dissimilaridade foi de 0,11, representando o nó 5 (fig. 1).

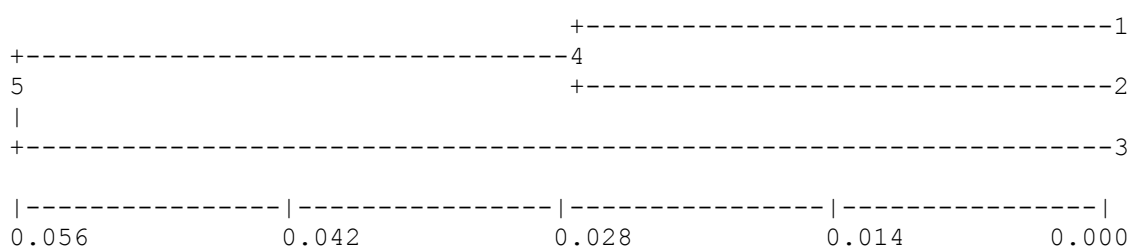


Figura1. Dendrograma de dissimilaridade, construído com o método UPGMA, baseado nas distâncias genética de Nei (1978), mostrando as relações genéticas entre as três populações de *Myrciaria dubia*/RO: 1 camu-camu SAE, 2 madeira e 3 montenegro.

Para avaliar graficamente a dispersão dos acessos amostrados nas três populações obtidas com os seis locos EST-SSR foi realizada uma Análise de Coordenadas Principais (Fig. 2). A variação genética explicada pelos dois primeiros eixos foi de 46, 74%. O gráfico mostra que os acessos não foram agrupados de acordo com sua população de origem, sendo que os acessos agrupados das três populações apresentam-se dispersos ao longo do gráfico (Fig. 2). Estes resultados indicam que existe pouca divergência genética entre as populações onde os acessos foram amostrados.

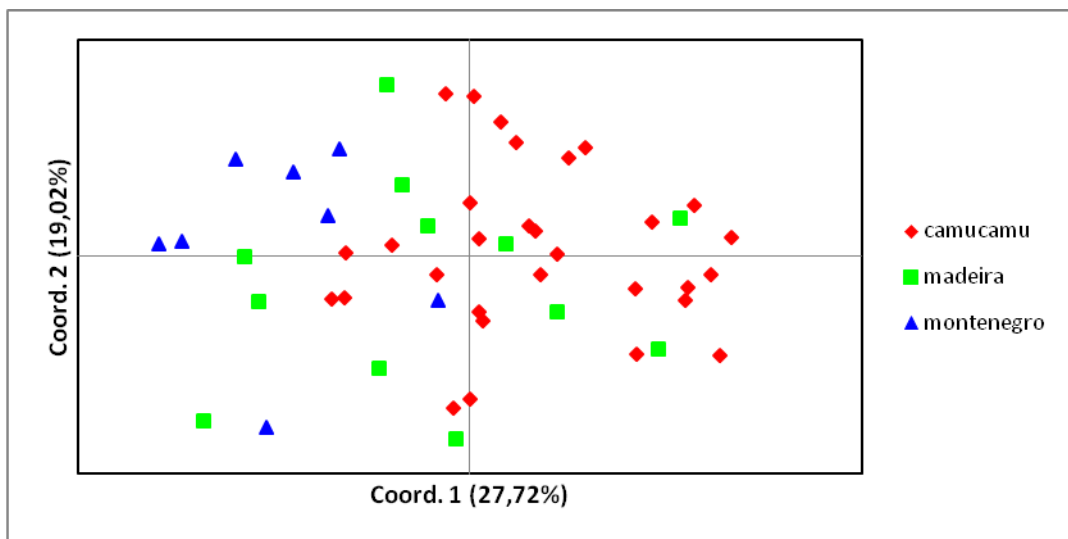


Fig.2 Gráfico de Análises de Coordenadas Principais com a distribuição dos acessos das três populações de *M. dubia*, em eixos que representam a variação genética revelada pelos seis locos EST-SSR.

A estimativa da distância genética, obtida entre as duas populações oriundas de locais de diferentes coletas, no rio Madeira, foi de apenas 5% revelando 95% de identidade, entre os acessos, o que permite sugerir tratar-se de uma população homogênea. Os agrupamentos das populações de *M. dubia* obtidos por Rojas Gonzalez (2007) dos rios de Rondônia, também separam as amostras do rio Jamari das do Madeira, sendo esta última mais próxima geneticamente das populações dos rios Uatumã/AM e Trombeta/PA. O Autor justifica que no caso do camu-camu, as distâncias espaciais e genéticas apresentaram correlação baixa e que o fluxo gênico pelo rio poderia influenciar essa correlação. Entretanto, se conhece muito pouco sobre o mecanismo de dispersão dessa espécie (ROJAS GONZALEZ, 2007). Koshikene (2009) em seu estudo verificou um agrupamento aleatório entre as populações

provenientes de Rondônia, sendo inconsistente com as áreas geográficas de origem. A hipótese previamente formulada, de que as 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 (KOSHIKENE, 2009).

Neste estudo, foi plotado um dendrograma com o algoritmo neighbor-joining baseado nas distâncias de Nei (1978), considerando apenas a população de camu-camu/SAE. No dendrograma (Fig. 3) pode ser observado três grupos definidos (grupos I, II e II). O grupo I contém três subgrupos, o que caracteriza os agrupamentos de plantas mais próximas, entre si. Ressaltando que a amostra C5, apesar ter sido coletada numa região diferentes dos acessos C26, C23 e C25, apresentam-se no dendrograma geneticamente mais próximas. Outro agrupamento interessante, também ocorre entre os indivíduos C1 e C30, coletados em locais diferentes, porém geneticamente próximos. De modo geral, o que se pode inferir sobre os agrupamentos do dendrograma de indivíduos amostrados na população camu-camu/SAE (Fig. 03), é que os agrupamentos dos acessos estão relacionados com a região geográfica onde eles foram coletados. Ressalta-se, neste, que houve agrupamento caracterizado pela relação genética, mesmo sendo as amostras obtidas em locais diferentes.

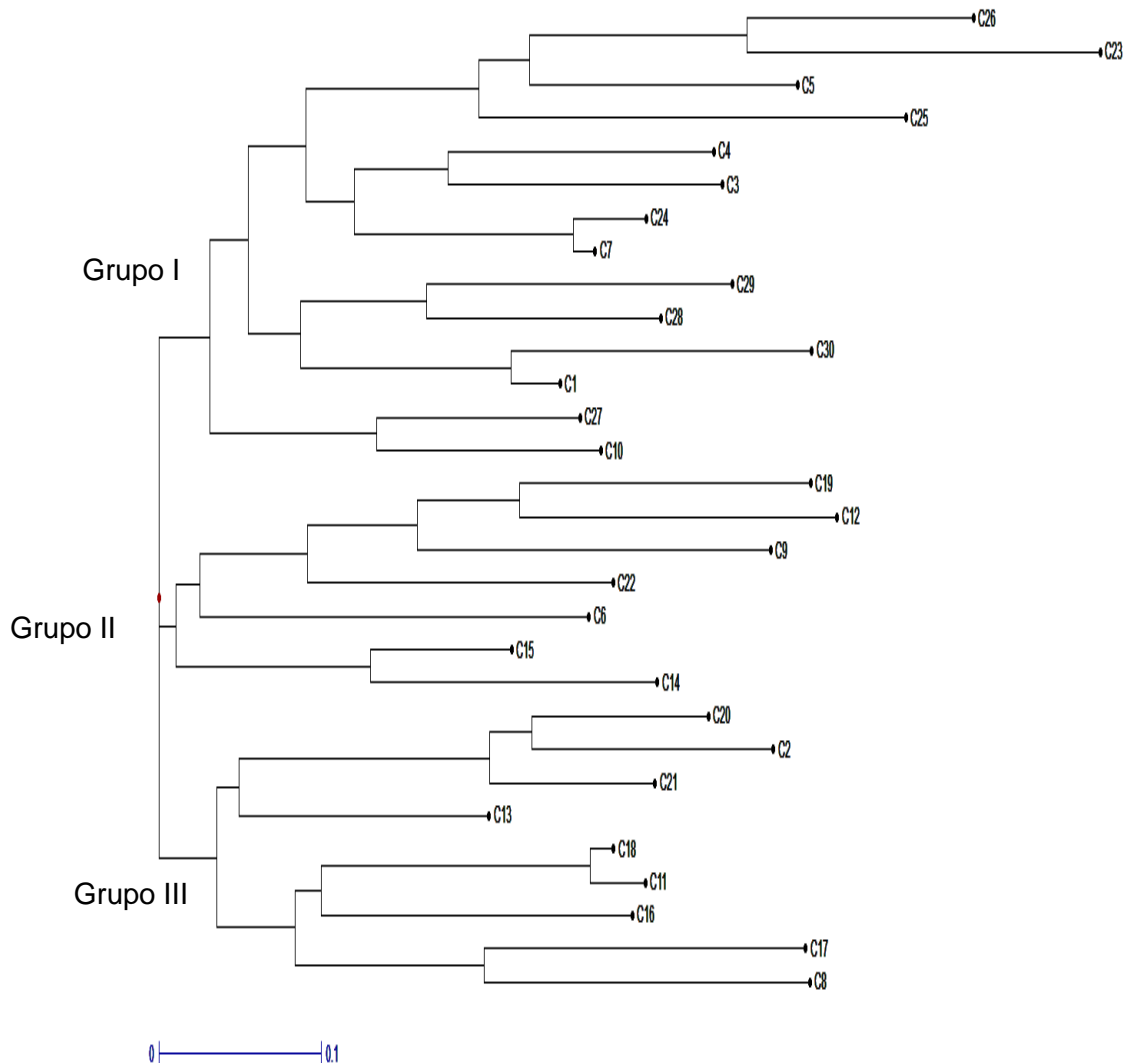


Fig. 03. Dendrograma construído com o método *neighbor-joining*, baseado em distância genética de Nei (1978), mostrando as relações genéticas entre os indivíduos de *M. dubia* amostrados na população camu-camu/SAE.

#### 4.3 Variação genética inter e intrapopulacional.

Para análise da Variação Molecular (AMOVA) agrupou-se as amostras das populações, camu-camu/SAE e madeira, em um só grupo e as amostras da população montenegro em outro. As análises foram realizadas entre as populações Madeira e Jamari. A estimativa da proporção total de variação genética foi maior dentro das populações (86,15%), do que entre os grupos de populações (7, 74%). O que está de acordo com Rojas Gonzalez (2007) que obteve 80,3% dentro e 19,7% entre as populações. Koshikene (2009) que encontrou 79,39% do total da variação dentro e 20,61% entre as populações.

A estimativa de divergência genética, representada pelo coeficiente de  $F_{ST}$  obtido no presente estudo foi de 0,077. Este valor pode ser considerado como intermediário, e foi significativamente diferente de zero ( $p=0,05$ ). Este coeficiente está relacionado com a parte da endogamia total, devido à deriva genética, independente do sistema reprodutivo. A partir da estimativa  $F_{ST}$  pode-se obter uma estimativa indireta do fluxo gênico, representado pelo número de migrantes ( $Nm$ ), 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: i) quando  $Nm > 1$  é considerado alto; ii) no intervalo  $0,25 < Nm < 0,99$  é considerado intermediário e; iii) baixo quando for  $Nm < 0,25$ . O valor  $Nm$  encontrado entre as populações de camu-camu/SAE e montenegro foi de 1 migrante por geração, que segundo Govindajaru (1989), indica um valor alto de fluxo gênico.

Considerando que os frutos de camu-camu fazem parte da alimentação de peixes, além disso; esta espécie é considerada hidrocórica e são insuficientes os conhecimentos sobre o sistema de dispersão de sementes, deve-se ter cautela ao inferir sobre a participação dos gametas, propágulos ou indivíduos na relação de troca de genes no processo de fluxo gênico para esta espécie (KOSHIKENE, 2009).

O índice de fixação  $F_{IT}$  obtido no presente estudo foi de 0,14 e representa a endogamia total da espécie ou desvio de panmixia da população total (devido ao sistema reprodutivo somado à subdivisão), para o conjunto das populações.

O índice de fixação intrapopulacional  $F_{IS}$  foi 0,06 o que significa que 6% dos cruzamentos ocorridos dentro das populações são endogâmicos. Este coeficiente de endogamia intrapopulacional refere-se aos desvios de panmixia, devido apenas ao sistema reprodutivo da espécie, sendo um indicativo da existência de possíveis cruzamentos entre indivíduos aparentados ou, especificamente no caso de plantas, a ocorrência de autofecundação (autogamia). Este fenômeno foi encontrado por Peters & Vásquez (1986; 1987; 1988), Cruz & Resende (2008) analisando o sistema reprodutivo de camu-

camu; Maués & Couturier (2002) verificaram que há sobreposição temporal das fases sexuais nas flores, o que facilita e propicia a ocorrência de autopolinização (KOSHIKENE, 2009). Rojas Gonzalez (2007) encontrou valores de  $F_{IT}$  (0,502) e de  $F_{IS}$  (0,377) mais elevados do que os encontrados neste estudo.

O coeficiente de endogamia é um parâmetro que afeta diretamente a diversidade genética de uma população, tendo sido introduzido por Wright (1951), e resume de forma conveniente, a estrutura de uma população (ZUCCHI, 2002).

Outros 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 (FRANKHAM *et al.*, 2008).

O conhecimento da variação genética entre e dentro de populações é a base para estabelecer estratégias eficazes para a conservação. Pois, mesmo a conservação e o manejo da biodiversidade em área protegidas, são desafios complexos que requerem apropriação das informações básicas, tais como: a distribuição e abundância de espécies, as interações mutualísticas, sobre a biologia reprodutiva e a estrutura genética de suas populações (FRANKHAM *et al.*, 2008).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a população de camu-camu coletada pode-se concluir que os valores de diversidade genética foram em geral intermediários, embora a maioria dos locos apresentaram déficit de heterozigotos, estando-se abaixo do esperado sob EHW.

A distância genética estimada entre os acessos coletados ao longo do rio madeira, revela índice de dissimilaridade baixo, sugerindo que as populações, das localidades abaixo da Usina Hidrelétrica de Santo Antônio compartilham com 95% dos recursos genéticos das populações acima da UHE.

Quanto à divergência genética, observou-se que a população em estudo não está estruturada e, que a distribuição das proporções de variação foi maior dentro do que entre as populações. O coeficiente de diferenciação foi baixo para as duas populações do rio Madeira e o índice de endogamia parece está relacionado ao sistema reprodutivo.

Os estudos genéticos em populações naturais visam conhecer a distribuição da variabilidade genética existente numa determinada espécie, bem como a maneira na qual esta variabilidade está distribuída entre e dentro de suas populações naturais e é crucial para a efetivação dos planos de conservação, manejo e melhoramento genético de uma espécie.

Conhecendo e entendendo a dinâmica da genética em população natural pode-se manter os recursos genéticos de populações que estão sendo submetidas a mudanças no ambiente, estabelecendo assim, estratégias de amostragem dessas populações naturais, seja para fins de conservação ou melhoramento genético (FRANKHAM *et al.*, 2008), permitindo a obtenção de amostras representativas, para minimizar os impactos antrópicos sobre os recursos genéticos. Considerando, que as duas populações do Madeira são homogêneas sugere-se a manutenção de um banco de germoplasma ativo da espécie, *in situ* (que já foi implantado, conforme relatório SAESA-PCFL-009-11 - Banco de Germoplasma) e *ex situ* (armazenamento de frutos e sementes no próprio laboratório que também foi realizado).

## 6. BIBLIOGRAFIA

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.

EXCOFFIER, L., LAVAL, G., SCHNEIDER, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolution Bioinformatics Online* 1:47–50.

FRANKHA, R., BALLOU, J. D., BRISCOE, D. A. *Fundamento de Genética de Conservação*. SBG. Ribeirão Preto- SP, 2008.

DIERINGER, D. & SCHLÖTTERER, C. 2003. Microsatellite analyzer (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* 3: 167–169.

GOUDET, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.

GOVINDAJARU, R.D. 1989. Variation in gene flow levels among predominantly self-pollinated plants. *Journal of Evolutionary Biology*. 2: 173-181.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. *Genetic data analysis: software for the analysis of discrete genetic data*. Version 1.0. Sunderland: Sinauer Associates Inc., 1997.

LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. *Analysis of population genetic structure with RAPD Markers*. *Molecular Ecology*, Oxford, v. 3, n. 2, p. 91-99, 1994.

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.

MYAMOTO, M.; KURAMOTO, N.; YAMADA, H. Differences in spatial autocorrelation between four sub-populations of *Alnus trabeculosa* Hand. - Mazz. (Betulaceae). *Heredity*, Essex, v. 89, n. 4, p. 273-279, Oct. 2002.

NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.

NEI, M. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press, 1987.



KOSHIKENE, D. Análise da Variabilidade Genética de Populações do Banco de Germoplasma de camu-camu (*Myrciaria dubia* (h.b.k.) Mc Vaugh) Utilizando Marcadores Microssatélites 2010. Tese desenvolvida pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais-PPGBTRN, no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA/Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Manaus, AM. 103p.

PEAKALL, R. & SMOUSE, P.E. 2006. GenAIEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.

PETERS, C. M.; VASQUEZ, A. 1987. Estudos ecológicos de camu-camu (*Myrciaria dubia*). I. Producción de frutos en poblaciones naturales. *Acta amazonica*. 16-17: 161-174.

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.

RODRIGUES, D. P. Diversidade genética e sistema de reprodução em progênies elites de pupunheira inerme (*Bactris gasipaes* Kunth) com marcadores microssatélites: implicações para o melhoramento do palmito, Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Brasil, 2007.

SÁNCHEZ, C.F.B. Diversidade Entre e Dentro de Populações Simuladas sob Deriva Genética. Dissertação desenvolvida pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. Viçosa-MG, 2008.

TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. Isoenzimas: variabilidade genética em plantas. Ribeirão Preto: SBG, 1995, 186 p.

WEIR, B. S. & COCKERHAM, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

WEIR, B.S. & BASTEN, C.J. 1990. Sampling strategies for DNA sequence distance. *Biometrics*. 26: 551-582.

WEIR, B. S. 1996. *Genetic data analysis: methods for discrete genetic data*. Sunderland: Sinauer Associates. 377p.

ZUCCHI, M.I. Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC. utilizando marcadores RAPD e SSR. 2002, 130p Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.



ZUCCHI, M. I., BRONDANI, R. P. V., PINHEIRO, J. B., CHAVES, L. J., COELHO, A. S. G. C. & VENCOVSKY, R. 2003. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. *Genetics and Molecular Biology* 26: 449-457.