



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA
REDE BIONORTE

**CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA E MOLECULAR DE
GENÓTIPOS DE *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh PROVENIENTES
DA AMAZÔNIA SETENTRIONAL**

RAÍSSA MARIA SAMPAIO DE PAIVA

Boa Vista - RR
OUTUBRO/ 2019

RAÍSSA MARIA SAMPAIO DE PAIVA

**CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA E MOLECULAR DE
GENÓTIPOS DE *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh PROVENIENTES
DA AMAZÔNIA SETENTRIONAL**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da rede BIONORTE, na Universidade Federal de Roraima, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Conservação ou Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Granja

Coorientador: Pesq. Dr. Edvan Alves Chagas

Boa Vista - RR
OUTUBRO/ 2019

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

P149c Paiva, Raíssa Maria Sampaio de.

Caracterização agronômica e molecular de genótipos de *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh provenientes da Amazônia Setentrional / Raíssa Maria Sampaio de Paiva. – Boa Vista, 2019.
79 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Granja.

Coorientador: Pesq. Dr. Edvan Alves Chagas.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte.

1 - Amazônia. 2 - Camu-camu. 3 - ISSR. 4 - Variabilidade genética.
I - Título. II - Granja, Fabiana (orientadora). III - Chagas, Edvan Alves (coorientador).

CDU - 634.42

Ficha Catalográfica elaborada pela Bibliotecária/Documentalista:
Maria de Fátima Andrade Costa - CRB-11/453-AM

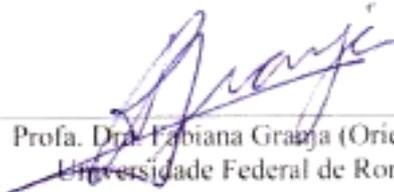
RAÍSSA MARIA SAMPAIO DE PAIVA

**CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA E MOLECULAR DE
GENÓTIPOS DE *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh PROVENIENTES
DA AMAZÔNIA SETENTRIONAL**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da rede BIONORTE, na Universidade Federal de Roraima, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Conservação ou Biotecnologia.

Aprovada em 09/05/2019

Banca examinadora



Profa. Dra. Fabiana Granja (Orientadora)
Universidade Federal de Roraima



Profa. Dra. Cassia Angela Pedrozo
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - RR



Profa. Dra. Pollyana Cardoso Chagas
Universidade Federal de Roraima



Prof. Dr. Oscar José Smiderle
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - RR



Profa. Dra. Lucianne Braga Oliveira Vilarinho
Universidade Federal de Roraima

AGRADECIMENTOS

“Deem graças em todas as circunstâncias, pois está é a vontade de Deus para vocês em Cristo Jesus” 1 Tessalonicenses 5:18

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, o meu criador e salvador, reconhecendo que sem Ele nenhuma conquista seria possível.

A CAPES pela concessão da bolsa e a Universidade Federal de Roraima por todo apoio logístico para o desenvolvimento do trabalho. Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais (PRONAT) e a EMBRAPA-RR pela infraestrutura disponibilizada para execução da pesquisa.

Ao CNPq e IACTI pelo auxílio financeiro concedido para execução desta pesquisa.

Agradeço a minha orientadora, mãe científica, amiga, conselheira, Profa. Dra. Fabiana Granja pela oportunidade concedida durante todo esse tempo em que caminhamos juntas. Por ter acreditado em mim e nunca ter desistido para que eu pudesse dar o meu melhor. Eu nunca conseguirei recompensar a senhora por todo amor e carinho, aqui eu registro o meu muito OBRIGADA!

Agradeço ao meu co-orientador, Prof. Dr. Edvan Alves Chagas, por me apresentar a beleza do camu-camu e toda sua importância. Foi muito importante ver como uma riqueza natural pode gerar renda na vida das pessoas. Viver o mundo da agronomia foi um desafio maravilhoso. Obrigada pela oportunidade e confiança.

Agradeço também a toda equipe LabMol, em especial a minha parceira Clediane Gomes de Souza, por ter vivenciado esse desafio junto comigo e apesar de todas as dificuldades aprendemos muito juntas. Foi ótimo dividir esses momentos com você.

Agradeço a equipe Nativa, em especial a Maria da Conceição Rocha Araújo, Ricardo Bardales, Sara Thielly por todo auxílio para que essa pesquisa pudesse ter sucesso, vocês foram fundamentais. Agradeço a Roberto Tadashi pela sua experiência em conduzir todo o experimento e pelo carinho ao dividir comigo seu trabalho, sem o senhor nada disso seria possível. Obrigada por me apresentar para essa oportunidade.

Agradeço ao quadro de professores do CBio, Pronat e Bionorte pelos ensinamentos e experiências trocadas durante toda essa caminhada acadêmica.

Agradeço ao meu marido, Herman Ricardo, por ter sonhado comigo durante todo esse tempo, por acreditar em mim, por me entender nos momentos de ausência. Eu amo você.

Agradeço a minha família, por todo apoio e incentivo.

Agradeço aos meus pastores pelas orações e cuidado.

Agradeço a todos que contribuíram para realização deste trabalho e que não me lembrei neste pequeno espaço de tempo. Deixo aqui meus sinceros agradecimentos!!!

Muito obrigada a todos!!!

PAIVA, Raíssa Maria Sampaio de. **Caracterização agronômica e molecular de genótipos de *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh provenientes da Amazônia Setentrional**. 2019. 79f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Conservação) – Universidade Federal de Roraima, Roraima, 2019.

RESUMO

O camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh) ou caçari é uma espécie frutífera nativa da bacia Amazônica que têm se destacado mundialmente pela riqueza em compostos antioxidantes, como o ácido ascórbico. Diante disso, a EMBRAPA-RR e a UFRR vêm realizando diversos estudos com o objetivo de caracterizar a variabilidade genética e assim avançar no melhoramento da espécie. Entretanto, ainda há falta de informações geradas usando técnicas de marcadores moleculares que permitam abreviar esse processo. Sendo assim, objetivou-se com este estudo identificar com base em características agronômicas e marcadores moleculares indivíduos com perfis genéticos diferentes da Coleção de Germoplasma de camu-camu da Embrapa-RR. Para isso, a pesquisa foi dividida em três etapas: 1) Primeiramente foi comparado e modificado protocolos para extração de DNA do camu-camu de Roraima. 2) Em seguida, foi analisada a variabilidade genética de 55 subamostras por meio de iniciadores ISSR e 3) por último as informações moleculares de 53 subamostras foram associadas a dados agronômicos para identificação mais completa dos genótipos da Coleção. As adaptações nos processos permitiram estabelecer um protocolo de extração de DNA para o camu-camu de acordo com as condições de trabalho apresentadas em Roraima possibilitando assim, analisar a variabilidade genética presente na Coleção de Germoplasma e constatar que AT08, AB08, AT13, BQ28, EV10, LR12 e IAB01 são os mais divergentes geneticamente. Ao unir os dados agronômicos com os dados moleculares notou-se que mais subamostras se diferenciaram, sendo elas: AB08, AT08, AT10, AT13, BQ04, EV10, LR12, IAB04, BQ28, MU06 e LR05. Dessa forma, é extremamente importante avaliar em campo o desenvolvimento vegetativo e a pós-colheita dessas subamostras, podendo verificar outros atributos agronômicos e selecionar genótipos que se desenvolvam bem no campo e ao mesmo tempo mantenham a variação presente do ambiente natural.

Palavras-chave: Amazônia, camu-camu, ISSR, variabilidade genética.

PAIVA, Raíssa Maria Sampaio de. **Agronomic and molecular characterization of *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh genotypes from Northern Amazonia.** 2019. 79f. Thesis (Doctorate in Biodiversity and Conservation) - Federal University of Roraima , Boa Vista , 2019.

ABSTRACT

Camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh) or Caçari is a native fruit species from the Amazon basin that has been noted worldwide for its richness in antioxidant compounds, such as ascorbic acid. Given this, EMBRAPA-RR and UFRR have been conducting several studies aiming to characterize the genetic variability and thus advance in the improvement of the species. However, there is still a lack of information generated using molecular marker techniques to abbreviate this process. Thus, the objective of this study was to identify, based on agronomic characteristics and molecular markers, individuals with different genetic profiles from the Embrapa-RR Camu-Camu Germplasm Collection. For this, the research was divided into three stages: 1) Firstly, we compared and modified protocols for DNA extraction from Roraima camu-camu. 2) Next, the genetic variability of 55 subsamples was analyzed using ISSR primers and 3) Finally, information from 53 subsamples was associated with agronomic data for more complete identification of the genotypes of the Collection. The process adaptations allowed us to establish a DNA extraction protocol for camu-camu according to the working conditions presented in Roraima, thus allowing to analyze the genetic variability present in the Germplasm Collection and to verify that AT08, AB08, AT13, BQ28, EV10, LR12 and IAB01 are the most genetically divergent. By combining the agronomic data with the molecular data, it was noted that more subsamples differed: AB08, AT08, AT10, AT13, BQ04, EV10, LR12, IAB04, BQ28, MU06 and LR05. Thus, it is extremely important to evaluate in the field the vegetative development and postharvest of these subsamples, being able to verify other agronomic attributes and to select genotypes that develop well in the field and at the same time maintain the present variation of the natural environment.

Keywords: camu-camu, ISSR, breeding, Roraima.

LISTA DE FIGURAS

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

Figura 1 - <i>Myrciaria dubia</i> apresentando diferentes fases fenológicas. A: Crescimento vegetativo. B: Florescimento. C: Frutificação. D: Maturação.....	21
--	----

CAPITULO I - MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE CAMU-CAMU

Figura 1 - Análise eletroforética do DNA genômico de <i>M. dubia</i> extraído através de três protocolos manuais e um kit comercial. λ = Dna Lambda (10ng/ μ l). De 1 a 8 amostras de <i>M. dubia</i>	44
Figura 2 - Extração de DNA de folhas de <i>M. dubia</i> armazenadas de diferentes formas. λ = DNA lambda (10ng/ μ l). FL = folha liofilizada. FC = Folha congelada a -80°C. FF = folha fresca. FGC = folha de goiaba congelada.....	45
Figura 3 - Comparação dos produtos de amplificação de DNA genômico de folhas de camu-camu armazenadas de diferentes formas. L = Marcador de peso molecular de 100pb (Ludwig). FL = folha liofilizada. FC = folha congelada. FF = folha fresca. FGC = folha de goiaba congelada.....	46

CAPITULO II – VARIABILITY OF *MYRCIARIA DUBIA* GENOTYPES (MYRTACEAE) IN THE GEOGRAPHIC GRADIENT OF THE NORTHERN AMAZON RAINFOREST

Figure 1 - Geographic location of the 11 different populations of <i>M. Dubia</i> throughout the Rio Branco basin, Roraima state.....	54
Figure 2 – Grouping the 55 sub-samples of <i>M. dubia</i> by the UPGMA method from the distance matrix obtained by the complement of the similarity coefficient of Nei and Li (1979).....	56

CAPITULO III – VARIABILIDADE GENÉTICA E AGRONÔMICA DO CAMU-CAMU DO ESTADO DE RORAIMA

Figura 1 - Localização georreferenciada das 11 populações de camu-camu em diferentes regiões edafoclimáticas.....	66
Figura 2 - Agrupamento das 53 subamostras de <i>M. dubia</i> pelo método UPGMA a partir	

da soma de matrizes de dados agrômicos (matriz 1) e moleculares com base em marcadores ISSR (matriz 2)..... 70

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I - MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE CAMU-CAMU

Tabela 1 - Diferenças entre as etapas dos protocolos baseados no método CTAB utilizados para extração de DNA de camu-camu.....	41
Tabela 2 - Valores de concentração e pureza das amostras extraídas por cada protocolo.....	43
Tabela 3 – Modificações nos protocolos selecionados para extração de DNA de camu-camu.....	45
Tabela 4 – Protocolo de extração de DNA de camu-camu.....	47

CAPITULO II – VARIABILITY OF *MYRCIARIA DUBIA* GENOTYPES (MYRTACEAE) IN THE GEOGRAPHIC GRADIENT OF THE NORTHERN AMAZON RAINFOREST

Table 1 – Populations of <i>M. Dubia</i> prospected at the state of Roraima, according to geographic coordinates	54
Table 2 – Sequence of initiators with their respective annealing temperatures (TA), number of bands generated (NB), number of polymorphic bands (BP), percentage of polymorphic bands per initiator (% BP), Approximate amplitude (in base pairs) of the amplified fragments (APb).....	55

CAPITULO III - VARIABILIDADE GENÉTICA E AGRONÔMICA DO CAMU-CAMU DO ESTADO DE RORAIMA

Tabela 1 – Contribuição relativa das variáveis de propagação vegetativa para a divergência genética entre 53 subamostras de <i>M. dubia</i>	67
Tabela 2 - Coeficiente de correlação e intervalo de confiança entre as matrizes de distância de dados de propagação vegetativa (matriz 1) e moleculares com base em marcadores ISSR (matriz 2), obtidos a partir da avaliação de 53 subamostras da Coleção de Germoplasma de camu-camu da Embrapa-RR.....	68
Tabela 3 - Agrupamento pelo método de otimização de Tocher, das 53 subamostras de <i>M. dubia</i> , obtidos a partir da correlação de dados agronômicos (matriz 1) e moleculares com base em marcadores <i>ISSR</i> (matriz 2), e agrupamento a partir de soma das matrizes 1 + 2.....	68

SUMÁRIO

RESUMO	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Recursos genéticos de fruteiras tropicais	14
2.2 Germoplasma Vegetal: Conservação e caracterização	14
2.3 Marcadores moleculares	17
2.4 Aspectos gerais do camu-camu	19
2.4.1 Classificação taxonômica e ocorrência.....	19
2.4.2 Características da espécie.....	20
2.4.3 Utilização e importância ecológica e econômica.....	21
2.5 Estudos e conservação de camu-camu em Coleções de Germoplasma: Ferramentas Moleculares	22
REFERÊNCIAS	25
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
CAPITULO I - MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE CAMU-CAMU	37
RESUMO	37
ABSTRACT	38
INTRODUÇÃO	39
MATERIAIS E MÉTODOS	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
CAPITULO II – VARIABILITY OF <i>MYRCIARIA DUBIA</i> GENOTYPES (MYRTACEAE) IN THE GEOGRAPHIC GRADIENT OF THE NORTHERN AMAZON RAINFOREST	50
ABSTRACT	50
RESUMO	51

INTRODUCTION.....	52
MATERIAL AND METHODS.....	52
RESULTS.....	55
DISCUSSION.....	57
CONCLUSIONS.....	58
REFERENCES.....	59
CAPITULO III – VARIABILIDADE GENÉTICA E MORFOLOGICA DO CAMU-CAMU DO ESTADO DE RORAIMA.....	62
RESUMO.....	62
ABSTRACT.....	63
INTRODUÇÃO	64
MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICES.....	76

1 INTRODUÇÃO

Desde meados da década de 70, o camu-camu (*Myrciaria dubia*) é encontrado naturalmente e vem sendo estudado em países como o Brasil e o Peru. Em 2017, uma iniciativa do Ministério do Meio Ambiente chamada “Plantas para o Futuro” identificou o camu-camu como uma espécie nativa com potencial alimentício, medicinal e ambiental (CORADIN; CAMILO; PAREYN, 2018)

Considerado um alimento funcional, os frutos do camu-camu possuem o maior teor de vitamina C registrado, auxiliando no combate aos radicais livres e contribuindo para proteção celular, especialmente em condições de inflamação e estresse oxidativo (PINEDO et al., 2010).

Devido a sua ampla distribuição pelas margens dos corpos hídricos do estado de Roraima, uma proposta produtiva, industrial e de exportação baseada principalmente no aproveitamento da polpa do camu-camu têm sido construída pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa – RR) e suas parceiras através do projeto “Domesticação, melhoramento e valorização de frutos Nativos da Amazônia”.

No ano de 2016, a Coleção de Germoplasma de camu-camu foi instalada na Embrapa-RR com genótipos provenientes de populações naturais dos estados de Roraima, Amazonas e Rondônia e que reúne a rica variabilidade genética do camu-camu. Desde então, diversas pesquisas utilizando descritores morfológicos e/ou agronômicos têm sido realizadas com o intuito de caracterizar a variabilidade existente e poder subsidiar o uso prático desse recurso em programas de melhoramento genético.

Porém, para acelerar a caracterização, o uso de ferramentas biotecnológicas como os marcadores moleculares é essencial pois, permitem selecionar genótipos baseados diretamente em informações contidas no DNA (FALEIRO; AMABILE; SILVA, 2018).

Para isso, se faz necessário o estabelecimento de protocolos de extração do DNA genômico. A extração de DNA é a primeira etapa para a utilização deste material em diferentes técnicas da genética molecular, e a sua pureza e qualidade são sempre os pré-requisitos principais (ARBI et al., 2010).

Posteriormente, a escolha do marcador molecular depende do objetivo proposto. Atualmente existe uma diversidade de marcadores disponíveis no mercado, dentre os quais podemos destacar os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), que têm sido amplamente utilizados na caracterização de espécies que apresentam potencial econômico, devido a sua

eficiência na identificação de polimorfismos ao longo de todo genoma vegetal permitindo a diferenciação entre os indivíduos.

Desta forma, ao longo do processo de caracterização da Coleção de Germoplasma, descritores agronômicos e os marcadores moleculares podem ser utilizados para monitorar a variabilidade genética dos genótipos e aumentar a eficiência do programa de melhoramento contribuindo para o desenvolvimento de novos materiais (OLIVEIRA, 2018).

Identificar indivíduos com bom desenvolvimento no campo é extremamente importante. No entanto, jamais devemos esquecer da necessidade de conservar a variação presente no ambiente natural e assim manter os alelos existentes, garantindo a preservação da espécie perante adversidades ambientais e potencializando o uso desses recursos nos programas de melhoramento genético.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Recursos genéticos de fruteiras tropicais

Os recursos fitogenéticos podem ser considerados como qualquer elemento vegetal com valor de uso atual ou potencial para o homem. Os recursos genéticos incluem a variabilidade genética existente entre as espécies vegetais, que sejam de interesse socioeconômico para serem utilizadas em programas de melhoramento, a fim de alcançar o desenvolvimento sustentável, tanto no âmbito agrícola quanto na indústria alimentícia e farmacêutica (NASS, 2001; BARBIERI, 2003; GOEDERT & WETZEL, 2007; GONÇALVES, 2016).

O marco inicial de estudos com foco na conservação e no uso dos recursos genéticos aconteceu na década de 1920 através do pesquisador Nikolai Vavilov, que foi um dos primeiros a definir o conceito de diversidade genética. Em suas expedições pelo mundo, Vavilov estabeleceu os centros de origem de espécies cultivadas através da relação entre sua diversidade e localização geográfica (BORÉM & MIRANDA, 2013; GONÇALVES, 2016).

Dentre os recursos genéticos vegetais voltados para a alimentação e agricultura, as espécies frutíferas se sobressaem pela grande diversidade e potencial que apresentam, sendo o Brasil o terceiro maior produtor mundial de frutas tropicais (PÁDUA & FERREIRA, 2012; SANTANA, 2016).

A região norte do país se destaca por possuir 44% da diversidade de frutas nativas do território nacional, no entanto, apenas 8% contribuem economicamente para o mercado brasileiro, ficando fora dessas estatísticas a maioria das espécies que ainda são pouco conhecidas quanto ao potencial de exploração econômico (CLEMENT et al., 2000; POLL et al., 2011).

Devido à pressão antropogênica, a introdução de espécies exóticas e a erosão genética, a diversidade de frutas tropicais está cada vez mais ameaçada (CRUZ-CRUZ; GONZÁLEZ-ARNAO; ENGELMANN, 2013) e por serem a base do melhoramento de plantas, a conservação, a caracterização e a avaliação dos recursos genéticos vegetais, são etapas necessárias e imprescindíveis à manutenção e a utilização desse material que constituem o germoplasma vegetal (DREW, 2000; FERREIRA & PINTO, 2010; NORMAH; CHIN; REED, 2013).

2.2 Germoplasma Vegetal: Conservação e caracterização

O termo germoplasma é definido como a base física da herança genética, transmitida de uma geração para outra por meio de células reprodutivas. Dependendo da espécie, são considerados germoplasmas: células, embriões, sementes, óvulos, espermatozoides, pólen, estacas, entre outros (IPGRI, 1991; COSTA & SPEHAR, 2012).

A escolha do germoplasma é de fundamental importância para um programa de melhoramento genético, pois suas características determinarão o potencial máximo ao qual a população submetida ao processo pode alcançar (HALLAUER & MIRANDA-FILHO, 1988; FONSECA, 2017).

Devido a expansão da fronteira agrícola sem a preocupação de preservar o meio ambiente e a domesticação de muitas espécies de plantas com a possibilidade de exaustão da variabilidade genética, a comunidade científica no final da década de 1960 promoveu a conservação do material hereditário de muitas espécies vegetais, especialmente aquelas de importância econômica (RIBEIRO, 2000; NASS et al., 2012).

Sendo assim, duas estratégias básicas de conservação foram definidas pela convenção sobre a diversidade biológica: a “*in situ*” e a “*ex situ*” (GROSS; JOHNSTON; BARBER, 2005).

A manutenção de espécies de plantas em seu habitat natural, bem como a conservação de espécies domesticadas e cultivadas “*on farm*” ou nos ambientes onde desenvolveram suas características distintivas representam as estratégias “*in situ*” (CRUZ-CRUZ; GONZÁLEZ-ARNAO; ENGELMANN, 2013). Em vários países, a principal estratégia adotada para este tipo de conservação é em forma de áreas protegidas, também denominadas unidades de conservação (SCARIOT & SEVILHA, 2007).

Diversos motivos levam ao estabelecimento de reservas genéticas para conservação “*in situ*”, tais como: a manutenção de um banco genético de espécies de interesse econômico ou potencial, como, por exemplo, uma floresta com altas densidades de castanheiras (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) na Amazônia; conservação em larga escala de um grande número de espécies e indivíduos a um custo relativamente baixo; proteção do ecossistema como um todo, preservando as interações ecológicas e evolutivas entre as espécies, entre outros (SIMON, 2010).

Em contrapartida, a conservação “*ex situ*” significa a proteção de componentes da diversidade biológica fora do seu habitat natural. A conservação “*ex situ*” é apropriada para a conservação das culturas e seus parentes selvagens (ENGELMANN, 2012), estando atualmente ≈16.500 espécies de plantas conservadas em 1750 bancos de gene em todo o mundo (FAO, 2010; SONINO, 2017).

As principais modalidades da conservação “*ex situ*” são: coleção de base, coleção ativa, coleção de campo, coleção “*in vitro*”, coleção em criopreservação, coleção nuclear e banco genômico (VALOIS, 1999). Essas modalidades são responsáveis por coletar, preservar, caracterizar, avaliar e posteriormente fazer o intercâmbio do germoplasma das espécies conservadas (BESPALHOK; GUERRA; OLIVEIRA, 2007).

No entanto, segundo Valois (1998), menos de 8% dos recursos constantes em bancos ou coleções de germoplasma são efetivamente utilizados pelos melhoristas. Entre os principais fatores da baixa utilização de genitores nos programas de melhoramento está o desconhecimento dos recursos genéticos disponíveis nos bancos de germoplasma por parte dos pesquisadores (CARELLI et al., 2006; MARIM et al., 2009).

A caracterização das subamostras depositadas nas coleções é de extrema impotência, pois incentiva a utilização desses recursos. A palavra "caracterizar" é também um sinônimo de "distinguir", isto é, marcar como separado ou diferente. Na terminologia acordada dos bancos de genes e gerenciamento de germoplasma, o termo "caracterização" representa a descrição de caracteres que geralmente são altamente hereditários, facilmente vistos pelo olho e igualmente expressos em todos os ambientes (IPGRI/CIP, 2003; VICENTE et al., 2005).

A partir dos dados de caracterização, e com o uso de metodologias genético-estatísticas específicas, é possível analisar a diversidade genética das diferentes subamostras e avaliar seu potencial de uso em programas de melhoramento (MARIM et al., 2009). Os descritores utilizados podem englobar tanto dados morfológicos (anatomia da planta, folhas, flores, etc.), agronômicos (ciclo de maturação, produtividade, etc.), genéticos (citológicos, DNA, etc.) e físico-químicos (aroma, sabor, acidez, etc.) (VELGA et al., 2012).

A caracterização das subamostras por meio dos descritores morfológicos e agronômicos são imprescindíveis, desde que as características sofram pouca influência de fatores abióticos e não apresentem dificuldades na identificação e avaliação dos caracteres (COSTA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2017).

A caracterização morfológica e agronômica é a primeira a ser realizada no germoplasma depois que ele é incorporado às coleções. Um aspecto importante é a padronização desses descritores. A Bioversity International (IPGRI) é o órgão que tem contribuído para a elaboração de descritores de várias espécies, cuja terminologia tem sido padronizada para facilitar o intercâmbio e a utilização do germoplasma, constituindo uma importante ferramenta na detecção de materiais duplicados (BURLE, 2010).

A descoberta de características de interesse torna-se essencial aos programas de melhoramento, uma vez que, permite a avaliação quantitativa e qualitativa de um caráter em relação a outro (FERREIRA et al., 2012; ARAÚJO, 2016).

Porém, os descritores morfológicos e agrônômicos podem ter limitações, sendo necessária a utilização de técnicas complementares ou mais abrangentes. Assim, os marcadores moleculares são ferramentas capazes de avaliar a diversidade genética mesmo entre indivíduos morfológicamente iguais (SILVA, 2017).

Diversas pesquisas têm combinado o uso de marcadores morfológicos e moleculares podendo subsidiar os trabalhos de melhoramento, na busca de cultivares mais produtivas e com características de superior qualidade (SOUZA, 2011).

2.3 Marcadores moleculares

Nas últimas décadas, o desenvolvimento e a aplicação das técnicas de marcação molecular induziram transformações consideráveis em diversos ramos da biologia (CARRER; BARBOSA; RAMIRO, 2010).

Os marcadores moleculares podem ser definidos como um *locus* polimórfico que informa sobre o genótipo do indivíduo, baseados na detecção de isoenzimas ou sequências de DNA. A análise desse polimorfismo por meio da biologia molecular é endereçada ao genoma como um todo, traduzido ou não em proteínas (ROCHA et al., 2003; FALEIRO et al., 2011).

Os marcadores moleculares apresentam várias vantagens sobre os marcadores morfológicos, por fornecer um número ilimitado de polimorfismos distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma e por serem independentes dos efeitos ambientais e do estágio fisiológico da planta, permitindo a identificação precisa dos genótipos em estádios iniciais do desenvolvimento (LANZA; GUIMARÃES; SCHUSTER, 2000).

O uso de marcadores moleculares tem tido cada vez mais destaque como uma ferramenta importante para o melhoramento genético de plantas, visando o mapeamento de genes, à análise de diversidade genética, os diagnósticos de doenças e os estudos taxonômicos e evolutivos (WÜNSCH & HORMAZA, 2007; SILVA et al., 2016).

Estudar a variabilidade genética é uma atividade de grande relevância para a melhoria das plantas e a conservação de muitas espécies. Através deste conhecimento, é possível identificar diferentes genótipos, com características de interesse, como fontes de resistência a doenças e alta produtividade e utilizá-los em programas de melhoramento (CRUZ & CARNEIRO, 2006; CHIMELLO et al., 2017).

Entre os marcadores moleculares que se baseiam na análise do DNA genômico, estão o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), os Minissatélites ou VNTR (*Variable Number Tandem Repeats*), o RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), os microssatélites e os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; SANTANA, 2016).

A técnica conhecida como ISSR tem se destacado como uma alternativa eficiente para a caracterização de genomas complexos, o que permite a detecção de polimorfismos em regiões flanqueadas por DNA microssatélite, sem a necessidade de isolar e sequenciar fragmentos específicos de DNA. A detecção de elevado grau de polimorfismo, alta reprodutibilidade, custo relativamente baixo e necessidade de pequenas quantidades de DNA são algumas das vantagens da técnica de ISSR (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994; CANÇADO et al., 2012). A principal desvantagem deste marcador é a sua dominância (GONZÁLES; AGUIRRE, 2007), impossibilitando a diferenciação de locos homozigóticos e/ou heterozigóticos (LOPES et al., 2002).

Os iniciadores ISSR normalmente apresentam um comprimento entre 16 e 25 pares de bases, de modo que as repetições microssatélites usadas podem ser di, tri, tetra ou pentanucleotídicas. A temperatura de anelamento varia em torno de 45 a 60°C e os iniciadores podem apresentar duas formas: os não ancorados que consistem apenas de um motivo repetido; e os ancorados na ponta 5' ou na 3', que apresentam, além do motivo repetido, um ou mais nucleotídeos em cada uma das extremidades (VIJAYAN, 2005; TIWARI et al., 2015; GOMES, 2017).

Diversos trabalhos na literatura revelam que o uso dos marcadores moleculares está complementando a caracterização morfológica e agrônômica tradicional (TOPPA & JADOSKI, 2013). Os marcadores ISSR tem se demonstrado eficientes em revelar a diversidade genética entre e dentro de plantas que apresentam importância econômica (ARAÚJO, 2016).

Goulão & Oliveira (2001) afirma que a utilização de marcadores de DNA pode reduzir o tempo requisitado para a caracterização de novos cultivares e/ou híbridos, principalmente em espécies frutíferas com longo período juvenil. Os mesmos autores afirmam que os marcadores microssatélites e ISSR são úteis na identificação de cultivares, devido a alta reprodutibilidade, apresentando assim, vantagens sobre outros métodos baseados em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). No mesmo sentido, Borba et al. (2005) dizem que a técnica de ISSR pode ser empregada para diferenciação rápida entre indivíduos aparentados,

devido ao elevado grau de polimorfismo, reprodutibilidade e também por ter um baixo custo (TOPPA & JADOSKI, 2013).

Em um estudo realizado com banana (*Musa* spp.) foram analisados 21 genótipos através de marcadores ISSR que se demonstraram eficientes em estimar a diversidade genética entre as espécimes analisadas (SILVA et al., 2017).

Outras investigações com uso de marcadores ISSR também têm sido realizadas com maracujá (PEREIRA; CORREA; OLIVEIRA, 2015), maçã (OCKU et al., 2015), espécies cítricas (SHARAFI; ABKENAR; SHARAFI, 2017), manga (ROCHA et al., 2012), umbu-cajazeira (SANTANA et al., 2011), goiaba (RAI et al., 2012), entre outros.

A jabuticabeira (*Plinia* sp.) é uma frutífera nativa também de importância econômica que pertence à família Myrtaceae. Em uma pesquisa, foi avaliado o perfil genético de 35 genótipos através de marcadores ISSR possibilitando verificar a existência de diversidade genética entre as populações analisadas (CRUZ et al., 2016).

Dentro da família Myrtaceae, outra espécie que encontra-se em processo de domesticação e têm se destacado economicamente é o camu-camu, como é conhecido popularmente, sendo considerado uma das fontes mais ricas de ácido ascórbico (vitamina C) de todas as espécies de plantas (ZAPATA & DUFOUR, 1993; ANDRADE et al., 1995; JUSTI et al. 2000; PINEDO et al., 2004; CHIRINOS et al., 2010; SMID et al., 2017).

O conhecimento sobre sua diversidade morfológica e genética é importante para a caracterização da espécie podendo ajudar a decidir quais populações devem ser protegidas e quantas plantas devem estar na população para evitar endogamia. A preservação do material genético é atualmente uma prática comum, e definir diversidade dentro e entre populações naturais é o primeiro passo para implementar um programa de melhoramento genético eficiente (VAISHALI & SHARMA, 2010; SMID et al., 2017).

2.4 Aspectos gerais do camu-camu

A região amazônica apresenta grande quantidade de espécies vegetais nativas produtoras de frutos comestíveis, que constituem um grupo muito importante tanto por seu consumo na dieta diária da população rural e urbana, como na alimentação de animais silvestres e domesticados (BACELAR-LIMA, 2009). Dentre estas espécies está o camu-camu que é também conhecido como caçari, araçá-d'água e araçá-de-igapó (FERREIRA, 1986; MERA, 1987).

2.4.1 Classificação taxonômica e ocorrência

O camu-camu é classificado botanicamente como uma planta da divisão Fanerógama; subdivisão Magnoliophyta (Angiosperma); classe Magnoliophysida (Dicotiledôneas); ordem Myrtales; família Myrtaceae; gênero *Myrciaria*; espécie *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh (YUYAMA & VALENTE, 2011; BARDALES et al., 2014).

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).

Porém, em termos taxonômicos, o camu-camu ainda precisa de investigações mais acuradas, devido à existência de inúmeros variantes morfológicos na espécie. Há indícios de ocorrência de pequenas populações de diferentes ecótipos em toda bacia do rio Solimões/Amazonas, chamando-se atenção para a existência de um tipo arbustivo e outro arbóreo, com status taxonômico ainda não definido (TEIXEIRA; CHAVES; YUYAMA, 2004). O camu-camu é encontrado em populações naturais monoespecíficas nas margens dos rios, lagos e igapós da Amazônia, porém, a maior concentração e diversidade das populações de camu-camu encontram-se na Amazônia Peruana (PETERS & VÁSQUEZ, 1988; VILLACHICA, 1996), tanto nas águas escuras como nas águas claras, sendo sujeito à inundação periódica (uma vez ou duas a três vezes ao ano), que podem durar de alguns dias até quatro meses nos grandes rios (YUYAMA; AGUIAR; YUYAMA, 2002).

A espécie distribui-se em parte da Amazônia Brasileira (Pará, Amapá, Amazonas, Rondônia, Roraima e Mato Grosso), as margens do médio e alto rio Amazonas até a parte oriental do Peru, ao longo do rio Casiquiare e a parte alta e média da bacia do rio Orinoco (MCVAUGH, 1969; ALVES; BORGES; MOURA, 2000). Contudo, Yuyama & Valente (2011) mencionam que seu centro de origem não está bem definido devido há falta de informações sobre o seu centro de dispersão, sabendo apenas que sua ocorrência natural se estende desde os rios do Brasil, passando pela Guiana Inglesa, Colômbia e Venezuela, não havendo nenhuma ligação com o Peru (CHÁVEZ FLORES, 1988).

Segundo Chagas et al. (2012), em Roraima as populações de camu-camu estão distribuídas por oito municípios do Estado nas áreas de abrangência de florestas, savanas e também em áreas de transição, porém, sempre associadas às margens de rios, igarapés ou lagos.

2.4.2 Características da espécie

A planta de camu-camu possui hábito arbustivo, podendo alcançar até 8 m de altura (MCVAUGH, 1958; KOSHIKENE, 2010), formando vários ramos secundários desde a

base, que por sua vez se ramificam na forma de um vaso aberto. O tronco e os ramos são glabros, cilíndricos, lisos, de coloração marrom claro ou avermelhada, cuja casca se desprende facilmente (SUGUINO; ARAÚJO; SIMÃO, 2001). As raízes são profundas (pivotantes) e do tipo cônica, com muitas raízes secundárias horizontais e pêlos absorventes (RUIZ, 1994; CORREA, 2000; SILVA, 2006).

As folhas são opostas, simples, sem estípulas, elípticas, ovais ou estreitas, de 4,5 a 10 cm de comprimento e 1,5 a 4,5 cm de largura, base obtusa ou arredondada, ápice longo acuminado e pecíolo de 3 a 6 mm de comprimento. Inflorescência mais ou menos axilar, geralmente formada por flores subsésseis, alvas e perfumadas (FERREIRA & RIBEIRO, 2006; OLIVEIRA, 2014). A fruta é uma baga esférica de 2,0 a 3,5 cm de diâmetro, casca fina, lisa e brilhosa, de cor vermelha passando a negro púrpura ao final da maturação, polpa succulenta, levemente rosada, com duas a três sementes (DELGADO, 2010).

Figura 1 - *Myrciaria dubia* apresentando diferentes fases fenológicas. A: Crescimento vegetativo da muda. B: Florescimento. C: Frutificação. D: Maturação.



Fonte: Almeida (2014)

Alguns trabalhos contêm informações sobre a biologia floral do camu-camu como o de Peters & Vasquez (1988), Villachica (1996), Maués & Couturier (2002), Bacelar-Lima (2009), Delgado et al. (2015), que consideram a espécie como alogáma facultativa, tendo sistema reprodutivo misto, endogamia e apomixia.

A dispersão das sementes é endozoocórica, feita principalmente por peixes como o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e pela própria correnteza dos cursos d'água (YUYAMA & SIQUEIRA, 1999).

2.4.3 Utilização, importância ecológica e econômica

As populações de camu-camu ocorrem naturalmente as margens de rios, lagos e igarapés. Seus ramos e raízes protegem as margens dos corpos hídricos e por vezes servem de abrigo para espécies aquáticas e terrestres. Os frutos fazem parte da alimentação de espécies da ictiofauna, como o Tambaqui, o Pacu (*Mylossoma* spp.), o Matrinchã (*Brycon cephalus*) e o Curimatã (*Prochilodus nigricans*) (MERA, 1987; PETERS & VASQUEZ, 1987).

O levantamento etnobotânico realizado por Pinedo et al. (2004) aponta o uso de diferentes partes do camu-camu para fins medicinais, principalmente por populações ribeirinhas. Da casca do caule e da raiz podem ser feitas infusões para o tratamento de diarreia e reumatismo. As raspas da casca podem ser utilizadas para aliviar dores musculares. A parte das folhas quando trituradas podem ser usadas para febre e dor de cabeça.

Após estudos de caracterização bioquímica e compostos bioativos presentes nos frutos, o camu-camu passou a ser um recurso químico muito importante. Foi constatado que a espécie é fonte promissora de polifenóis, antocianinas, ácido elágico, flavonóides, carotenóides e ácido ascórbico. A alta concentração de ácido ascórbico (que pode conter até 8000 mg de vitamina C para 100g⁻¹ da polpa fresca) e a estabilidade do composto após processado (GRIGIO et al., 2017), tornou a espécie um potencial econômico para a indústria alimentícia e farmacológica. Sua polpa *in natura* ou liofilizada é exportada principalmente para os Estados Unidos, França e Japão (SAUDÁVEL, 2001; ZANATTA & MERCADANTE, 2007; SMIRDELE & SOUSA, 2008; CHIRRINOS et al., 2010; AKTER et al., 2011; CHAGAS et al., 2012; SANTANA et al., 2016).

Utilizando a polpa *in natura* podem ser elaborados sucos e refrescos, sorvetes e doces, vinhos, coquetéis, vinagres, licores e geleias. Além desses, a polpa pode ser processada para produção de bebidas gaseificadas, sachê da polpa liofilizada, pastilhas de vitamina C e cosméticos para rosto, corpo e cabelo (RIVA RUIZ, 1994; YUYAMA; AGUIAR; YUYAMA, 2002; MAEDA & ANDRADE, 2003; RODRIGUES et al., 2004).

2.5 Estudos e conservação de camu-camu em Coleções de Germoplasma: Ferramentas Moleculares

Instituições de pesquisa brasileiras e peruanas vêm desenvolvendo trabalhos sobre a domesticação de *M. dubia*, através de programas de melhoramento genético para cultivo em terra firme (CLEMENT; MÜLLER; FLORES, 1982; COUTURIER et al. 1999).

No Peru, as pesquisas em relação ao camu-camu se encontram em fases avançadas de desenvolvimento. As primeiras coleções foram implantadas a partir da década de 80, resultando hoje em cinco coleções de germoplasma base. O programa de melhoramento

genético foi construído apenas em 2004 pelo Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP) e os estudos básicos de caracterização morfológica, propagação, aspectos reprodutivos, químicos e farmacológicos da espécie já foram realizados (PANDURO et al, 2004; CRUZ & RESENDE, 2008; CANALES, 2013).

No Brasil, no ano de 1978, foram implantadas subamostras de camu-camu no Banco de Germoplasma (BAG) de Fruteiras Tropicais do INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (YUYAMA & VALENTE, 2011). Com a descoberta da ocorrência desta espécie em praticamente toda bacia Amazônica, os pesquisadores interessados em estudos com camu-camu iniciaram as suas atividades em 1994 e a partir de 1996, o INPA iniciou a coleção de camu-camu nativo da bacia Amazônica Brasileira (YUYAMA, 2011). Atualmente, os trabalhos de prospecção de germoplasma, conservação e melhoramento são realizados pela Embrapa Amazônia Ocidental, Embrapa Amazônia Oriental, Embrapa Roraima e Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (YUYAMA, 2002; CRUZ & RESENDE, 2008; SCHWENGBER et al., 2010; CHAGAS et al., 2012).

Os primeiros estudos de variabilidade genética foram realizados através da análise de caracteres vegetativos, reprodutivos e químicos (SCHWENGBER et al., 2010; CORREA et al., 2011; PINEDO et al., 2011; NASCIMENTO et al. 2013; NASCIMENTO et al., 2014; CHAGAS et al., 2015; LOZANO et al., 2016; PANDURO et al., 2017). Esses estudos estavam em busca de parâmetros que fossem capazes de indicar uma ampla variação genética entre os indivíduos, permitindo assim, sistematizar as informações obtidas e apontar critérios para a seleção de plantas superiores.

A avaliação fenotípica do material genético acumula informações abundantes sobre a resposta genética e ambiental expressa na planta (PANDURO, 2012).

Panduro e Davila (2011) analisaram 108 progênies de camu-camu selecionadas como promissoras para produção de frutos, verificando se os parâmetros vegetativos estavam relacionados a precocidade de frutificação. Posteriormente, essas mesmas progênies foram avaliadas no ano de 2014 em relação ao grau de herdabilidade e a variabilidade dos parâmetros agrônomicos permitindo selecionar 25 indivíduos que se destacaram em relação a produção precoce de frutos e a resistência a pragas (PANDURO et al., 2014).

Em um outro estudo, seis subamostras de camu-camu em uma área de transição de floresta/savana foram avaliados em relação ao seu desenvolvimento vegetativo (ALMEIDA et al., 2014), concluindo que as mesmas apresentaram uma boa adaptabilidade nas novas condições. Chagas et al. (2015) ao analisar 16 populações do estado de Roraima, observaram que as mesmas continham uma alta variabilidade genética, indicando que o massa média dos

frutos, o conteúdo de sólidos solúveis e ácido ascórbico são as características mais discriminantes para seleção intraespecífica de camu-camu nativo.

O conhecimento da diversidade genética existente em subamostras de camu-camu é de grande importância para o êxito de programas de melhoramento e para a exploração dos recursos genéticos disponíveis (NUNES et al., 2014). No entanto, ainda há uma falta de informações geradas usando técnicas de marcadores moleculares para esta espécie (LOZANO, 2013).

O primeiro estudo reportado na literatura foi realizado utilizando marcadores de isoenzimas de esterase e esterase-D para avaliar três populações de camu-camu (Iquitos no Peru, Cauamé em Roraima e Uatumã no Amazonas), demonstrando que ocorrem diferenças genéticas entre elas (TEIXEIRA; CHAVES; YUYAMA, 2004).

No Peru, Garcia-Davilla et al. (2008) analisaram a variabilidade genética entre e dentro de cinco populações naturais (Napo, Tigre, Ucayali, Curaray e Putumayo) de camu-camu através de marcadores DALP (Amplificação Direta de Polimorfismo de Comprimento), encontrando diferentes níveis de diversidade genética intrapopulacional.

Os marcadores microssatélites, foram utilizados por Koshikene (2009) para caracterização dos exemplares existentes no BAG do INPA.

Rojas; Clement; Nagao (2011) analisaram 17 populações de camu-camu de diferentes rios da Amazônia brasileira, conservados no BAG de camu-camu do INPA na cidade de Manaus, utilizando marcadores EST-SSR (*Expressed Sequence Tags – Microsatellite*). Foram encontrados dois grupos principais pela análise da distância genética (Grupo 1 formado pelas populações de Rondônia, Amazônia Oriental, Pará e Fronteira Brasil-Peru; Grupo 2, populações de Roraima e Amazônia Ocidental), coincidindo com as áreas de coleta; entretanto, não foi encontrada correlação entre distâncias geográficas e distâncias genéticas.

Devido a variação observada no conteúdo de ácido ascórbico (Vitamina C) tanto dentro como entre indivíduos, Castro et al. (2015) objetivou reunir, caracterizar e anotar quais fatores genéticos presentes nos frutos de *M. dubia* são reponsáveis por essas variações, a fim de reconstruir as vias metabólicas e determinar se múltiplas vias contribuem para a biossíntese da vitamina C.

Recentemente, a diversidade genética entre 94 subamostras de *M. dubia* coletados ao longo das margens do Lago Reis, localizado no município de Caracaraí, Roraima, usando marcadores ISSR foi analisada por Nunes et al. (2017). Neste mesmo ano no Peru, 13

populações naturais e cultivadas foram caracterizadas em relação aos aspectos morfológicos e genéticos através de marcadores microssatélites (SMID et al., 2017).

Diante disso, fica evidente que os estudos genéticos através de marcadores moleculares ainda são escassos com o camucamuzeiro que encontra-se em fase de pré-melhoramento, sendo importante estimar os parâmetros genéticos para conhecer a estrutura das populações existentes nas coleções e assim garantir o sucesso do programa de melhoramento desta cultura (FEHR, 1987; NASCIMENTO et al., 2014).

REFERÊNCIAS

AKTER, M. S.; OH, S.; EUN, J. B.; AHMED, M. Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review. **Food Research International**, v.44, n.7, p.1728-1732. 2011.

ALMEIDA, L. F. P. **Avaliação do desenvolvimento inicial de acessos de camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth)McVaugh) em diferentes condições edafoclimáticas no estado de Roraima.** Tese (Doutorado em Botânica), INPA, Manaus, 2014.

ALMEIDA, L. F. P.; YUYAMA, K.; CHAGAS, E. A.; LOZANO, R. M. B.; ALBUQUERQUE, T. C. S.; RODRIGUEZ, C. A.; QUEIROZ, F. B. Early Evaluation of Camu-Camu Subsamples in Transition Savanna/Forest Area. **Journal of Agricultural Science**, v. 6, n. 11, p. 1-9. 2014.

ALVES, R. E.; BORGES, M. F.; MOURA, C. F. H. 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. 2000.

ANDRADE, J. S.; ARAGÃO, C. G.; GALEAZZI, M. A.; FERREIRA, S. A. N. Changes in the concentration of total vitamin C during maturation and ripening of camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh) fruits cultivated in the upland of Brazilian central Amazon. **Acta Horticulturae**, v. 370, n.29, p. 177-180, 1995.

ARAÚJO, E. S. **Variabilidade genética em gergelim por meio de marcadores moleculares e morfoagronômicos.** Dissertação (Mestrado em ciências agrárias), Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

BACELAR-LIMA, C. G. **Estudos da biologia reprodutiva, morfologia e polinização aplicados à produção de frutos de Camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh) adaptadas à terra firme da Amazônia Central/Brasil.** Tese (Doutorado em Botânica), INPA/UFAM, Manaus, 2009.

BARBIERI, R. L. Conservação e uso de recursos genéticos vegetais. In: FREITAS, L.B. de; BERED, F. **Genética & Evolução Vegetal.** Porto Alegre: UFRGS, p. 403- 413. 2003.

BARDALES, A. E. M.; PISCO, E. G. C.; FLORES, A. J. F.; MASHACURI, N. R.; RUIZ, M. C.; CORREA, S. A. I.; GÓMEZ, J. C. C. Semillas e plântulas de *Myrciaria dubia* 'camu-camu': biometría, germinación y crecimiento inicial. **Scientia Agropecuária**, v.5, n.1, p.85-92. 2014.

- BESPALHOK, J. C. F.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. Uso e conservação do germoplasma. In: BESPALHOK, J. C. F.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. **Melhoramento de Plantas**. Paraná: Universidade Federal do Paraná, p.21-28. 2007.
- BORBA, R. S.; GARCIA, M. S.; KOVALLESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; BRANCO, J. S. C.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v.34, n.4, p.565-569, 2005.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 6. ed. Viçosa: UFV, 523p. 2013.
- BURLE, M. L. **Manual de curadores de germoplasma – Vegetal: Caracterização morfológica**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 15p. 2010.
- CANALES, A. C. **El camu-camu: Aspectos químicos, farmacológicos y tecnológicos**. Peru: ICA, 156p. 2013.
- CANÇADO, G. M. A.; SANT'ANA, G. C.; VAL, A. D. B.; FERREIRA, J. L. Marcadores moleculares de DNA e suas aplicações na caracterização, identificação e melhoramento genético da oliveira. In: OLIVEIRA, A. F. (Ed.) **Oliveira no Brasil: Tecnologias de Produção**. Minas Gerais: EPAMIG, p.225-249. 2012.
- CARELLI, B. P.; GERALD, L. T. S.; GRAZZIOTIN, F. G.; ECHEVERRIGARAY, S. Genetic diversity among Brazilian cultivars and landraces of tomato *Lycopersicon esculentum* Mill. revealed by RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.53, n.2, p.395-400, 2006.
- CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. Biotecnologia na agricultura. **Estudos avançados**, v. 24, n. 70, p. 149-164. 2010.
- CASTRO, J. C.; MADDOX, J. D.; COBOS, M.; REQUENA, D.; ZIMIC, M.; BOMBARELY, A.; IMÁN, S. A.; CERDEIRA, L. A.; MEDINA, A. E. De novo assembly and functional annotation of *Myrciaria dubia* fruit transcriptome reveals multiple metabolic pathways for L-ascorbic acid biosynthesis. **BMC Genomics**, v. 16, n. 997, p. 1 – 13, 2015.
- CHAGAS, E. A.; BACELAR-LIMA, C. G.; CARVALHO, A. dos S.; RIBEIRO, M. I. G.; SAKAZAKI, R. T.; NEVES, L. C. Propagação do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh). **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 6, n. 1, p. 67-73, 2012.
- CHAGAS, E. A.; LOZANO, R. M. B.; CHAGAS, P. C.; BACELAR-LIMA, C. G.; GARCIA, M. I.; OLIVEIRA, J. V.; SOUZA, O. M.; MORAIS, B. S.; ARAÚJO, M. C. R. Intraspecific variability of camu-camu fruit in native populations of northern Amazonia. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 265-271, 2015.
- CHAVEZ FLORES, W. B. A importância econômica do camu-camu. **Toda fruta**, v. 3, n. 27, p. 36-37. 1988.
- CHIMELLO, A. M.; JESUS, J. G.; TEODORO, P. E.; ARAÚJO, K. L.; MAROSTEGA, T. N.; NEVES, L. G.; BARELLI, M. A. A. Morphological descriptors and ISSR molecular markers in the evaluation of genetic variability of *Tectona grandis* genotypes. **Genetics and Molecular Research**, v.16, n.2, p.1-16, 2017.

- CHIRINOS, R.; GALARZA, J.; BETALLELUZ-PALLARDEL, I.; PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D. Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. **Food Chemistry**, v.120, n.4, p.1019-1024, 2010.
- CLEMENT, C. R.; MÜLLER, C. H.; FLORES, W. B. Recursos genéticos de espécies frutíferas nativas da Amazônia. **Acta Amazonica**, v.12, n.4, p.677-695, 1982.
- CLEMENT, C. R.; NETO, J. T. F.; CARVALHO, J. E. U.; SOUZA, A. G. C.; GONDIM, T. M. S.; LEDO, F. J. S.; MULLER, A. A. **Tópicos atuais em botânica: Fruteiras nativas da amazônia: o longo caminho entre caracterização e utilização**. Brasília, DF: 2000.
- CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Nordeste**. Brasília, DF: MMA, 2018.
- CORREA, S. I. **Cultivo de camu-camu *Myrciaria dubia* H.B.K. en la region loreto**. Lima-Perú: INIA, 32p. 2000.
- CORREA, S. I.; FREYRE, S. P.; ALDANA, M. M. Caracterización morfológica y evaluación de la colección nacional de germoplasma de camu camu *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh, del INIA Loreto-Perú. **Scientia Agropecuaria**, v. 2, n.4, p. 189-201. 2011.
- COSTA, A. M.; SPEHAR, C. R. Base genética da diversidade. In: COSTA, A. M.; SPEHAR, C. R.; SERENO, J. R. B. **Conservação de recursos genéticos no Brasil**. Brasília: Embrapa, p. 21-65. 2012.
- COSTA, F. R.; SANTANA, T. N.; SUDRÉ, C. P.; RODRIGUES, R. Marcadores RAPD e caracteres morfoagronômicos na determinação da diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 696-704, 2009.
- COUTURIER, G.; SILVA, J. F.; SILVA, A. B.; MOTTA, M. M. **Comunicado Técnico 3: Insetos que atacam o camu-camuzeiro (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) em cultivos paraenses**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 1999.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2ed. Viçosa: UFV, 585p. 2006.
- CRUZ, C. O.; RESENDE, M. D. V. Mejoramiento genético y tasa de autofecundación del Camu camu arbustivo en la Amazonia peruana. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 450-454, 2008.
- CRUZ, E. S.; DANTAS, A. C. V. L.; CARMO, C. D.; BASTOS, L. P. MOLECULAR Characterization of jaboticaba tree genotypes located in the municipalities of recôncavo of Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 38, n. 3, p.1-9, 2016.
- CRUZ-CRUZ, C. A.; GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, F. Biotechnology and conservation for plant diversity. **Resources**, v.2, [s.n], p.73–95, 2013.
- DELGADO, J. P. M. **Efeito da adubação e a poda na arquitetura de mudas de camu camu**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), INPA, Manaus, 2010.

- DELGADO, J. P. M.; DELGADO, P. M.; RODRIGUEZ, C. A.; LOZANO, R. M. B. Rooting of Camu-Camu (*Myrciaria dubia*) in Different Propagation Systems and Reproductive Phases. **Journal of Agricultural Science**; v. 7, n. 5, p.118-123, 2015.
- DREW, R. A. Biotechnology and conservation of tropical fruit species. **Acta Horticulturae**, v. 583, [s.n.], p.183-188, 2000.
- ENGELMANN, F. Germplasm collection, storage, and conservation. In: ALTMAN, A.; HASEGAWA, P. **Plant Biotechnology and Agriculture**. EUA: Academic Press, p. 255-267, 2012.
- FALEIRO, F. G.; AMABILE, R. F.; VILELA, M. S. Marcadores moleculares aplicados ao melhoramento genético de plantas. In: AMABILE, R. F.; VILELA, M. S.; PEIXOTO, J. R. **Melhoramento de plantas: variabilidade genética, ferramentas e mercado**. Brasília: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, p. 51-72, 2018.
- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; OLIVEIRA, E. J.; PEIXOTO, J. R.; COSTA, A. M. **Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro: histórico e perspectivas**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 36 p. 2011.
- FAO. **The Second Report on the State of the World's Plant Genetic Resources**. Roma: FAO, 370p. 2010.
- FEHR, W. R. **Principles of cultivars development**. New York: Mac Millan, 536p. 1987.
- FERREIRA, F. R.; PINTO, A. C. Q. Germplasm conservation and use of genebanks for research purposes of tropical and subtropical fruits in Brazil. **Acta Horticulturae**, v. 864, [s.n], p. 21-27, 2010.
- FERREIRA, J. P.; SCHMILDT, O; SCHMILDT, E. R.; PIANTAVINHA, W. C.; CATTANEO, L. F. Correlações entre características morfoagronômicas de acessos de mamoeiro. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.14, p.246-257, 2012.
- FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220p. 1998.
- FERREIRA, M. G. R.; RIBEIRO, G. D. **Comunicado Técnico 306: Coleção de fruteiras tropicais da Embrapa Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 14p. 2006.
- FERREIRA, S. A. N. Camu-camu. **Informativo da Sociedade Brasileira de fruticultura**, v.5, n.2, p.11-12, 1986.
- FONSECA, K. G. **Validação de descritores, caracterização e diversidade genética de cultivares de espécies comerciais e silvestres de maracujazeiro**. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2017.
- GARCIA-DAVILLA, C.; CORAZÓN-GUIVIN, M.; CASTRO, D; CHOTA, W; RODRÍGUEZ, A.; DELGADO-VÁSQUEZ, C.; RENNO, J. F. Variabilidad genética de cinco poblaciones naturales de camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. MC.VAUGH) de la amazonía peruana, evaluadas mediante DALP. **Folia Amazónica**, v.17, n.1-2, p.91 – 98. 2008.
- GOEDERT, C. O.; WETZEL, M. M. V. S. Sistema de curadorias de germoplasma e o programa de conservação e uso de recursos genéticos do sistema Embrapa. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 25-60, 2007.

- GOMES, M. F. C. **Diversidade e estrutura genética em populações de *Anacardium spp.* do Parque Nacional de Sete Cidades (PI) por meio de marcadores ISSR.** Dissertação (Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento), Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.
- GONÇALVES, A. R. **Variabilidade genética molecular em uma coleção de germoplasma de *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae).** Dissertação (Mestrado em genética e melhoramento de plantas) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.
- GONZÁLES, A.; AGUIRRE, X. Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs). In: EGUIARTE, L.; SOUZA, V.; AGUIRRE, X. (Eds.). **Ecologia molecular.** México: Instituto Nacional de Ecología, p. 567-571. 2007.
- GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v.122, p.81-89, 2001.
- GRIGIO, M. L.; CHAGAS, E. A.; RATHINASABAPATHI, B.; CHAGAS, P. C.; DA SILVA, A. R. V.; SOBRAL, S. T. M.; DE OLIVEIRA, R. R. Qualitative evaluation and biocompounds present in different parts of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit. **African Journal of Food Science**, v. 11, n. 5, p.124-129. 2017.
- GROSS, T.; JOHNSTON, S.; BARBER, C. V. **A Convenção sobre Diversidade Biológica: Entendendo e Influenciando o Processo.** Brasília: Instituto de Estudos Avançados da Universidade das Nações Unidas, 72p. 2005.
- GUTIERREZ R., A. **Especies frutales nativas de la selva del Peru: estudio botánico e de propagación de semillas.** Monografía (Curso de agronomía) - Universidad Nacional Agraria, Lima. 1969.
- HALLAUER, A. R.; MIRANDA FILHO, J. B. **Quantitative genetics in maize breeding 2.** Ed. Ames: Iowa State University Press, 468 p. 1988.
- IPGRI. **Elsevier's dictionary of plant genetic resources.** Roma: International Board for Plant Genetic Resources, 187p. 1991.
- IPGRI/CIP. **Descriptores del Ulluco (*Ullucus tuberosus*).** Roma: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, 42p. 2003.
- JUSTI, K. C.; VISENTAINER, J. V.; SOUZA, N. E., MATSUSHITA, M. Nutritional composition and vitamin C stability in stored camu-camu (*Myrciaria dubia*) pulp. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 50, n.4, p. 405-408, 2000.
- KOSHIKENE, D. **Análise da variabilidade genética de populações do Banco de Germoplasma de Camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) utilizando marcadores microssatélites.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), INPA/UFAM, Manaus, 2010.
- LANZA, M.A.; GUIMARAES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, v. 21, n. 204, p. 97-108, 2000.

LOPES, M. S.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores Moleculares Dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.5, n.29, p. 56-60, 2002.

LOZANO, R. M. B. **Caracterização intraespecífica da variabilidade biométrica de frutos em populações nativas de camu-camu**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Agronomia). Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2013.

LOZANO, R. M. B.; CHAGAS, E. A.; SMIRDELE, O.; RODRIGUEZ, C. A.; CHAGAS, P. C.; MOTA FILHO, A. B.; SOUZA, O. M.; CORDEIRO, A. C. C. Genetic Divergence among Camu-Camu Plant Populations Based on the Initial Characteristics of the Plants. **Journal of Agricultural Science**, v. 8, n. 11., p.51-58, 2016.

MAEDA, R. N.; ANDRADE, J. S. Aproveitamento do camu-camu (*Myrciaria dubia*) para produção de bebida alcoólica fermentada. **Acta Amazonica**, v. 33, n. 3, p. 489-498, 2003.

MARIM, B. G.; SILVA, D. J. H.; CARNEIRO, P. C. S.; MIRANDA, G. V.; MATTEDI, A. P.; CALIMAN, F. R. B. Variabilidade genética e importância relativa de caracteres em acessos de germoplasma de tomateiro. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.44, n.10, p. 1283-1290, 2009.

MAUÉS, M. M.; COUTURIER, G. Biologia floral e fenologia reprodutiva do Camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mac Vaugh) no Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 4, p.441-448, 2002

McVAUGH, R. Botany of the Guyana highland. Party VIII. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, v.18, n.2, p.55-286, 1969.

MCVAUGH, R. Flora of Peru IV – 2. **Field Museum of Natural History – Botany**, v.13, [s.n], p. 780-781. 1958.

McVAUGH, R. Tropical american myrtaceae. **Fieldiana Botany**, v.29, n.8, p.393-532, 1963.

MERA, P. A. S. Camu-camu *Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh. In: PRANCE, G.T. **Botânica econômica de algumas espécies amazônicas**. Manaus: INPA/FUA, s.p. 1987.

NASCIMENTO, W. M. O. do; GURGEL, F. de L.; BHERING, L. L.; RIBEIRO, O. D.; SOARES, A. C. S. **Avaliações preliminares de parâmetros genéticos de acessos de *Myrciaria dubia* por marcadores fenotípicos**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 27p. 2013.

NASCIMENTO, W. M.; GURGEL, F. L.; BHERING, L. L.; RIBEIRO, O. D. Pré-melhoramento do camucamuzeiro: estudo de parâmetros genéticos e dissimilaridade. **Revista Ceres**, v. 61, n.4, p. 538-543, 2014

NASS, L. L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, cap 2, p. 29-55. 2001.

NASS, L. L.; SIGRIST, M. S.; RIBEIRO, C. S. C.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Genetic resources: the basis for sustainable and competitive plant breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.2, [s.n], p. 75-86, 2012.

NORMAH, M. N.; CHIN, H. F.; REED, B. M. (Eds.). **Conservation of Tropical Plant Species**. New York: Springer-Verlag, 538p. 2013.

- NUNES, C. F.; PIO, L. A.; PASQUAL, M.; SANTOS, E. G.; CHAGAS, E. A. Diversidade genética de acessos de camu-camu (*Myrciaria dubia*) baseado em marcadores ISSR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 23, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá, MT: Sociedade Brasileira de Fruticultura (SBF) 2014.
- NUNES, C. F.; SETOTAW, T. A.; PASQUAL, M.; CHAGAS, E. A.; SANTOS, E. G.; SANTOS, D. N.; LIMA, C. G. B.; CANÇADO, G. M. A. *Myrciaria dubia*, an Amazonian fruit: population structure and its implications for germplasm conservation and genetic improvement. **Genetics and Molecular Research**, v.16, n.1, p. 1-12. 2017.
- OKCU, M.; KALKISIM, O.; OKCU, Z.; KARABULUT, B.; YILDIRIM, N.; AGAR, G. Determination of Genetic Diversity Among Wild Grown Apples from Eastern Black Sea Region in Turkey Using ISSR and RAPDs Markers. **Erwerbs-Obstbau**, v. 57, [s.n], p. 171-177. 2015.
- OLIVEIRA, J. S. Recursos genéticos de *Passiflora* spp.: Diversidade genética, caracterização morfoagronômica, molecular, germinação e armazenamento de sementes. **Tese de Doutorado (Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária)**. Brasília, 2018.
- OLIVEIRA, J. S.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; VIEIRA, E. A.; VIANA, M. L. Caracterização fenotípica e diversidade genética de *Passiflora* spp. baseada em descritores multicategóricos. **Revista Ciências Agrárias**, v. 60, n. 3, p. 223-234, 2017.
- OLIVEIRA, T. C. S. **Principais compostos bioativos e capacidade antioxidante da polpa do camu-camu (*Myrciaria dubia*) em diferentes estádios de maturação**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia, Belém, 2014.
- PÁDUA, J. G.; FERREIRA, F. R. Recursos genéticos de Espécies Frutíferas. In: COSTA, A. M.; SPEHAR, C. R.; SERENO, J. R. B. **Conservação de recursos genéticos no Brasil**. Brasília: Embrapa, p. 350-379. 2012.
- PANDURO, M. P. Análisis de correlación y heredabilidad en el mejoramiento genético del camu-camu. **Scientia Agropecuaria**, v. 3, n. 1, p. 23 – 28. 2012.
- PANDURO, M. P.; CHAGAS, E. A.; DAVILA, E. P.; RODRIGUEZ, C. A.; LOZANO, R. B.; CHAGAS, P. C.; MELO, V. F. Selection of Superior Genotypes in 37 Clones of Camu-Camu by Repetitvity Analysis. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 6, p.175-187, 2017.
- PANDURO, M. P.; DAVILA, E. P. Evaluacion preliminar de 108 progênies precoces de camu-camu *Myrciaria dúbia* (Myrtaceae) en Loreto, Peru. **Folia Amazónica**, v. 20, n. 1-2, p. 77-82. 2011.
- PANDURO, M. P.; DAVILA, E. P.; RODRIGUEZ, C. A.; LOZANO, R. M. B.; CHAGAS, E. A. Selección temprana de plantas de (*Myrciaria dubia* H.B.K Mc Vaugh) camucamu, en un ensayo de progenies de polinizacion abierta. **Folia Amazónica**, v. 23, n.1, p. 39-48. 2014.
- PEREIRA, D. A.; CORRÊA, R. X.; OLIVEIRA, A. C. Molecular genetic diversity and differentiation of populations of ‘somnus’ passion fruit trees (*Passiflora setacea* DC): Implications for conservation and pre-breeding. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.59, [s.n.], p.12-21. 2015.

- PETERS, C.; VASQUEZ, A. Estudios Ecológicos de Camu-camu (*Myrciaria dubia*) Producción de frutos en poblaciones naturales. **Acta Amazônica**, v. 16/17, n° único, p. 161-174, 1988.
- PANDURO, M. P.; LINARES, C.; MENDOZA, H.; ANGUIZ, R. **Plan de mejoramiento genético de camu camu**. Iquitos: Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana, 52p. 2004.
- PINEDO, P. M.; DELGADO, V. C. FARROÑAY, P. R.; DEL CASTILLO, T. D.; IMAN, C. S.; VILLACRÉS, V. J.; FACHING, M. L.; OLIVA, C. C.; ABANTO, R. C.; BARDALES, L. R.; VEGA, V. R. **Camu-camu (*Myrciaria dubia*, Myrtaceae): Aportes para seu aprovechamiento sostenible en la amazonia peruana**. Iquitos: Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana, 137p. 2010.
- PINEDO, S.; IMAN, S.; PANDURO, M.P.; VASQUEZ, A.; COLLAZOS, H. Clonal trial of five genotypes of “camu-camu”, *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc. Vaugh, in non-flooded área. **African Journal of Plant Science**, v. 5, n. 1, p. 40-46. 2011.
- POLL, H; ZAMBERLAN, A. V.; KIST, B. B.; SANTOS, C.; CARVALHO, C.; REETZ, E. R.; BELING, R. R. **Anuário Brasileiro da Fruticultura 2011**. Santa Cruz do Sul: Gazebo, 128p. 2011.
- RAI, M. K.; PHULWARIA, M.; HARISH; GUPTA, A. K.; SHEKHAWAT, N. S.; JAISWAL, U. Genetic homogeneity of guava plants derived from somatic embryogenesis using SSR and ISSR markers. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 111, n. 2, p.259-264, 2012.
- RIBEIRO, C.S.C. Criando novas variedades. In: REIFSCHNEIDER, F.J.B. (org.) **Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília: Embrapa Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças, p. 68-80. 2000.
- RIVA RUIZ, R. **Tecnología de producción agronómica del camu-camu**. In: CURSO AMAZONÍA PERUANA, Pucallpa. Memória... Pucallpa: INIA, 13-18p. 1994.
- ROCHA, A.; SALOMÃO, L. C. C.; SALOMÃO, T. M. F.; CRUZ, C. D.; SIQUEIRA, D. L. Genetic Diversity of ‘Uba’ Mango Tree Using ISSR Markers. **Molecular Biotechnology**, v. 50, n.2, p.108-113, 2012.
- ROCHA, R. B.; PERREIRA, J. F.; CRUZ, C. D.; QUEIROZ, M. V.; ARAÚJO, E. F. O mapeamento genético no melhoramento de plantas. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.30, p.27-32, 2003.
- RODRIGUES, R. B.; MENEZES, H. C.; CABRAL, L. M. C.; DORNIER, M.; RIOS, G. M.; RYNES, M. Evaluation of reverse osmosis and osmotic evaporation to concentrate camu-camu juice (*Myrciaria dubia*). **Journal of Food Engineering**, v. 63, n. 1, p. 97-102, 2004.
- ROJAS, S.; CLEMENT, CH. Y. K.; NAGAO, E. O. Diversidade genética em acessos do banco de germoplasma de camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc. Vaugh) do INPA usando marcadores microssatélites (EST-SSR). **Revista Corpoica – Ciencia y tecnologia agropecuária**. Colombia, v. 12, n.1, p. 51-64, 2011.
- RUIZ, R. R. Manejo e industrializacion de los frutales nativos en la amazonia peruana. In: **Curso sobre manejo e industrialización de los frutales nativos en la amazonía peruana**. Pucallpa: INIA, p. 09-18. 1994.

- SANTANA, I. B. B.; OLIVEIRA, E. J.; SOARES FILHO, W. S.; RITZINGER, R.; AMORIN, E. P.; COSTA, M. A. P. C.; MOREIRA, R. F. C. **Variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR**. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 33, n. 3, p. 868-876, set. 2011.
- SANTANA, J. G. S. **Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em população natural de cambuizeiro (*Myrciariatenella o. Berg*)**. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2016.
- SANTANA, S. R.; BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; ALMEIDA, A. R.; OLIVEIRA, C. A. Uso do camu-camu (*Myrciaria dubia* (KUNTH) McVaugh) entre os pescadores do município de Presidente Médici, Rondônia, Brasil. **FLOVET**, v. 1, n. 8, p. 17-26. 2016.
- SAUDÁVEL camu-camu: suco da fruta com alto teor de vitamina C é obtido em pó e microencapsulado. **Pesquisa FAPESP**, n. 64, p. 64-65. 2001.
- SCARIOT, A.; SEVILHA, A. C. Conservação in situ de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L. (Eds.) **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 474-509. 2007.
- SCHWENGBER, J. A. M.; CHAGAS, E. A.; PIO, R.; DUARTE, O. R.; ALBUQUERQUE, T. C. S.; NEVES, L. C.; DONINI, L. P. Variabilidade de acessos de camu-camu oriundos de população nativa do estado de Roraima. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 21, Natal. **Anais...** Natal, RN: Sociedade Brasileira de Fruticultura (SBF) 2010.
- SHARAFI, A. A.; ABKENAR, A. A.; SHARAFI, A. Molecular genetic diversity assessment of Citrus species grown in Iran revealed by SSR, ISSR and CAPS molecular markers. **Journal of Science**, v. 2, n. 8, p. 22-27, 2017.
- SILVA, A. V. C.; NASCIMENTO, A. L. S.; VITÓRIA, M. F.; RABBANI, A. R. C.; SOARES, A. N. R.; LEDO, A. S. Diversity and genetic stability in banana genotypes in a breeding program using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. **Genetics and Molecular Research**, v.16, n.1, p. 1-9, 2017.
- SILVA, B. M.; ROSSI, A. A. B.; DARDENGO, J. F. E.; ARAUJO, V. A. A. C.; ROSSI, F. S.; OLIVEIRA, L. O.; CLARINDO, W. R. Diversidade genética estimada com marcadores entre sequências simples repetidas em cultivos comerciais de Cupuaçuzeiro. **Ciência Rural**, v.46, n.1, p.108-113, 2016.
- SILVA, D. C. **Diversidade química, genética e estudo do potencial formicida de óleos essenciais de *Eplingiella fruticosa* (Salzm.Ex Benth) Harley & J.F.B. Pastore**. Tese (doutorado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2017.
- SILVA, M. L. **Estudo de genes expressos em frutos de camu-camu: seqüenciamento de ESTs**. Tese (Doutorado Multi-institucional em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006.

- SIMON, M. F. **Manual de curadores de germoplasma – Vegetal: Conservação in situ.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 13p.
- SMÍD, J.; KALOUSOVÁ, M.; MANDÁK, B.; HOUŠKA, J.; CHLÁDOVÁ, A.; PINEDO, M.; LOKJA, B. Morphological and genetic diversity of camu-camu [*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh] in the Peruvian Amazon. **PLoS ONE**, v.12, n.6., s.p., 2017.
- SMIDERLE, O. J.; SOUSA, R. C. P. Teor de vitamina C e características físicas do camu-camu em dois estádios de maturação. **Revista agro@ambiente On-line**, v. 2, n. 2, p. 61-63, 2008.
- SONNINO, A. International Instruments for Conservation and Sustainable Use of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture: An Historical Appraisal. **Diversity**, v.50, n.9, p. 1-19, 2017.
- SOUZA, I. G. B. **Caracterização morfológica e molecular do bacurizeiro (*Plantonia insignis* Mart.).** Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.
- SUGUINO, E.; ARAÚJO, P. S. R.; SIMÃO, S. **Cultivo do camu-camu (*Myrciaria dubia*).** Piracicaba: ESALQ, 37p. 2001.
- TEIXEIRA, A. S.; CHAVES, L. S; YUYAMA, K. Esterases no exame da estrutura populacional de Camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh - Myrtaceae). **Acta Amazônica**, v.34, n. 1, p. 89-96. 2004
- TIWARI, J. K.; POONAM, P.; SAURABH, S.; DEVI, S.; ALI, N.; BHARDWAJ, V.; SINGH, B. P. Molecular characterization of potato somatic hybrids by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Potato Journal**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2015.
- TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 1, p.1-5, 2013.
- VAISHALI, S. K.; SHARMA, V. Genetic differentiation and diversity analysis of medicinal tree *Syzygium cumini* (Myrtaceae) from ecologically different regions of India. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.16, n.2, p.149-158, 2010.
- VALOIS, A. C. C. A biodiversidade e os recursos genéticos. In: QUEIROZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. **Recursos genéticos e Melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro.** Petrolina/Brasília: Embrapa Semi-Arido e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 1-3. 1999.
- VALOIS, A.C.C. **Genética aplicada a recursos fitogenéticos.** Brasília: UNEB, 318p. 1998.
- VELGA, R. F. A.; BARBOSA, W.; TOMBOLATO, A. F. C.; VALLS, J. F. M. Bancos de germoplasma: importância e organização. In: COSTA, A. M.; SPEHAR, C. R.; SERENO, J. R. B. **Conservação de recursos genéticos no Brasil.** Brasília: Embrapa, p. 104-125. 2012.
- VICENTE, M. C.; GUZMÁN, F. A.; ENGELS, J.; RAO, R. Genetic characterization and its use in decision making for the conservation of crop germplasm. In: RUANE, J.; SONNINO, A. **The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources.** Turin: FAO, p. 121-128. 2005.

- VIJAYAN, K. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Polymorphism and Its Application in Mulberry Genome Analysis. **International Journal of Industrial Entomology**, v.10, n. 2, p.79-86, 2005.
- VILLACHICA, H. **El cultivo del camu-camu** (*Myrciaria dubia* H.B.K. McVaugh) en la Amazonia Peruana. Lima: Tratado de cooperación Amazónica, 95p. 1996.
- WÜNSCH, A.; HORMAZA J. I. Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple. **Scientia Horticulturae**, v.113, [s.n.], p.37-43, 2007.
- YUYAMA, K. A.; AGUIAR, J. P. L.; YUYAMA, L. K. O. Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina C. **Acta Amazonica**, v. 32, n. 1, p. 169-174, 2002.
- YUYAMA, K. 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) – PPG7** /Subprograma de Ciência e Tecnologia – SPCeT /Ministério da Ciência e Tecnologia, s.p. 2002.
- YUYAMA, K. Melhoramento de camu-camu. In: YUYAMA, K; VALENTE, J. P. (orgs.) **Camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh)**. 1ed. Curitiba, PR: CRV, cap.6. 2011.
- YUYAMA, K.; SIQUEIRA, J. A. S. Efeito do tamanho das sementes e do recipiente no crescimento de mudas de camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Acta Amazônica**, v. 29, n. 4, p. 647-650, 1999.
- YUYAMA, K.; VALENTE, J. P (orgs.). **Camu-camu *Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh**. 1.ed. Curitiba, PR: CRV, 216p. 2011.
- ZANATTA, C. F.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu–camu (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v. 101, [s.n.], p. 1543–1549, 2007.
- ZAPATA, S. M.; DUFOUR, J. P. Camu-camu *Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh: Chemical composition of fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 61, n.3, p. 349-351, 1993.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR): anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v.20, n.2, p.176-183, 1994.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar através de características agronômicas e marcadores moleculares subamostras divergentes de *M. dubia* da Coleção de Germoplasma da Embrapa-RR visando auxiliar o processo de melhoramento para suprir as demandas futuras desta cultura.

3.2 Objetivos específicos

1. Padronizar um protocolo de extração de DNA para a *M. dubia*;
2. Caracterizar a variabilidade genética em níveis hierárquicos (interpopulacional e intrapopulacional) entre subamostras de *M. dubia*, através de marcadores ISSR;
3. Estimar as distâncias genéticas entre as populações e avaliar sua possível relação com a distância geográfica;
4. Correlacionar a variabilidade genética e agronômica de variáveis obtidas a partir das subamostras de *M. dubia* do estado de Roraima;
5. Indicar subamostras divergentes para futuros programas de melhoramento genético.

CAPITULO I – COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE CAMU-CAMU

RESUMO

O camu-camu (*Myrciaria dubia*) é um arbusto tropical nativo da Amazônia que produz frutos com altas concentrações de vitamina C (3 a 8g/100g polpa), além de compostos fenólicos e carotenoides, tendo grande potencial econômico na produção de derivados alimentícios e farmacológicos. Porém, apesar de sua importância como recurso natural, existem poucos estudos referentes a biologia molecular da espécie. Diante disso, objetivou-se comparar diferentes formas de armazenamento e estabelecer um protocolo para o isolamento do DNA genômico de camu-camu, adequado para posteriores análises moleculares. Foram testados três protocolos diferentes baseados no método CTAB e utilizado um kit comercial como controle. As folhas foram liofilizadas, congeladas e utilizadas frescas a fim de definir a melhor forma de armazenamento. O protocolo de Gomez et al. (2012) e de Doyle e Doyle (1987) adaptado pela Embrapa-RR apresentaram os resultados mais satisfatórios, similares ao kit comercial, com concentrações que variaram de 268 ng/μl a 4095,76 ng/μl. A razão de pureza estava dentro do esperado com médias de 1,82 e 2,12, respectivamente. Esses protocolos sofreram modificações em busca de aumentar a quantidade de material obtido, eliminar o arraste vertical no gel e a contaminação por RNA. Após as alterações foi obtido uma concentração média de 1071,88 ng/μl e uma razão de pureza média de 2,0, na visualização em gel de agarose a 0,8% observou-se que o DNA apresentou bandas únicas sem fragmentação e ausência de contaminação por RNA possibilitando que todas as diferentes formas de armazenamento demonstrassem um padrão de amplificação similar na PCR.

Palavras-chave: biologia molecular, DNA genômico, protocolo.

CHAPTER I - COMPARISON OF METHODS FOR EXTRACTION OF CAMU-CAMU GENOMIC DNA

ABSTRACT

Camu-camu (*Myrciaria dubia*) is a tropical shrub native to the Amazon producing fruits with high concentrations of vitamin C (3 to 8g / 100g pulp), as well as phenolic compounds and carotenoids, with great economic potential in the production of food derivatives and pharmacological. However, despite its importance as a natural resource, there are few studies concerning the molecular biology of the species. The objective of this study was to compare different forms of storage and to establish a protocol for the isolation of camu-camu genomic DNA, suitable for subsequent molecular analyzes. Three different protocols were tested based on the CTAB method and a commercial kit was used as a control. The leaves were lyophilized, frozen and used fresh to define the best form of storage. The protocol of Gomez et al. (2012) and Doyle and Doyle (1987) adapted by Embrapa-RR showed the most satisfactory results, similar to the commercial kit, with concentrations ranging from 268 ng / μl to 4095.76 ng / μl . The purity ratio was within expected range with averages of 1.82 and 2.12, respectively. These protocols were modified in order to increase the amount of material obtained, eliminate the vertical drag on the gel and RNA contamination. After the changes an average concentration of 1071.88 ng / μl and an average purity ratio of 2.0 was obtained in the 0.8% agarose gel visualization the DNA showed single bands without fragmentation and absence of RNA contamination allowing all different forms of storage to demonstrate a similar PCR amplification pattern.

Keywords: molecular biology, genomic DNA, protocol.

INTRODUÇÃO

O Camu-Camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh), também conhecido no Brasil como “Caçari” (CHAGAS et al., 2012), é um arbusto de ampla distribuição geográfica pela Amazônia Peruana, Colombiana, Brasileira e Venezuelana, tendo despertado interesse científico e comercial pela alta concentração de ácido ascórbico (que pode conter até 6000 mg de vitamina C para 100g da polpa fresca) e pela estabilidade do composto após processado (GRIGIO et al., 2017), tornando a espécie um potencial econômico para a indústria alimentícia e farmacológica (BARDALES et al., 2014; CHAGAS et al., 2015; RIBEIRO et al., 2016). Seus frutos são principalmente comercializados em vários mercados mundiais como os do Japão, França, Alemanha e Estados Unidos (GARCÍA-DÁVILA et al., 2008; IMÁN et al., 2011).

No entanto, apesar de toda sua importância econômica, são ainda incipientes os trabalhos onde buscam informações sobre a variação genética/molecular que auxilie o processo de melhoramento, permitindo a obtenção de cultivares com caracteres selecionados para suprir as demandas futuras desta cultura (PANDURO et al., 2004; ROJAS et al., 2011).

A análise da variabilidade genética com marcadores moleculares enfrenta barreiras no processo de extração de DNA. A presença de polissacarídeos, fenóis e compostos secundários se tornam um obstáculo na extração de um DNA vegetal de boa qualidade (ROMANO & BRASILEIRO, 1999; GRUTZMACHER et al., 2002; SILVA, 2010).

Segundo DANNER et al. (2011) a maioria dos protocolos de extração de DNA de plantas descritos na literatura utiliza o método baseado no detergente CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio), com algumas modificações de acordo com características da espécie (SCHMITT et al., 2014).

O procedimento para isolar o DNA deve cumprir alguns requisitos importantes. A coleta e o armazenamento do tecido, assim como o estado do mesmo são fundamentais para o sucesso da extração, permitindo obter uma boa quantidade de DNA que seja necessária para cada técnica molecular a ser utilizada posteriormente. Outro aspecto a considerar é que o material genético deve ser íntegro e com alto grau de pureza (COSTA & MOURA, 2001; GOMEZ et al., 2012).

O objetivo deste trabalho foi otimizar um protocolo de extração para o isolamento de DNA genômico de camu-camu armazenado de diferentes formas e que fosse adequado para posteriores análises moleculares, tecendo comentários sobre as dificuldades encontradas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos para a extração do DNA de camu-camu foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular (LaBMol) do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais (PRONAT) da Universidade Federal de Roraima (UFRR). As amostras de folhas para a realização dos testes foram retiradas da Coleção de germoplasma de camu-camu localizada no Campo Experimental Serra da Prata da Embrapa-Roraima. As mesmas foram lavadas com água destilada, acomodadas em sacos de papel filtro já identificados e acondicionadas em sacos plásticos com fecho hermético. Os sacos plásticos foram mantidos em caixa com gelo durante a coleta e o transporte até o LaBMol-UFRR, sendo conservadas em freezer à -80°C até o momento da realização dos procedimentos de extração de DNA.

Os testes para definição do melhor protocolo constaram de duas etapas: Primeiramente foram testados três protocolos diferentes (Tabela 1) baseados no método CTAB sendo substituído do protocolo original apenas o uso do nitrogênio líquido e de centrifuga refrigerada de acordo com as dificuldades locais já descritas por PAIVA et al. (2014). Os protocolos usados foram o de PAIVA et al. (2014), utilizado na rotina do LaBMol-UFRR, o de GOMEZ et al. (2012) utilizado para isolamento de DNA da espécie em estudo, e por último um protocolo baseado no método de extração de DOYLE & DOYLE (1987) desenvolvido pelo laboratório de Biologia Molecular da Embrapa-Roraima para extração de DNA do camu-camu. Foi realizada uma extração controle através do Kit *Invisorb® Spin Plant Mini* seguindo as normas do fabricante.

Na segunda etapa, após análise dos resultados dos testes iniciais, foram selecionados os protocolos de GOMEZ et al. (2012) e o da Embrapa-Roraima baseado no método de DOYLE & DOYLE (1987), pois apresentaram melhor qualidade e quantidade do DNA por amostra extraída.

Foram coletadas novas amostras da mesma Coleção de germoplasma para serem submetidas a diferentes formas de armazenamento (liofilizadas, congeladas e frescas) na realização dos novos testes de extração. Foi utilizado como controle positivo uma espécie da mesma família botânica, mas pertencente a outro gênero *Psidium guajava* L. (Goiaba).

Através da espectrofotometria foi determinada a quantidade e a qualidade do DNA extraído, em espectrofotômetro FEMTO Cirrus 80 MB. A razão entre 260nm/280nm foi utilizada para determinação do grau de pureza. Além disso, as amostras de DNA foram submetidas a eletroforese em gel agarose 0,8%, coradas com GelRed™ (1:500) e utilizado um padrão de concentração conhecida (*Lambda DNA cl857 Sam7*) como referência. Os géis foram visualizados e documentados em fotodocumentador digital EasyDoc 200.

Tabela 1 - Diferenças entre as etapas dos protocolos baseados no método CTAB utilizados para extração de DNA de camu-camu.

Etapas	Protocolos		
	Gomez et al. (2012)	Paiva et al. (2014)	Doyle e Doyle (1987) adaptado
Rompimento de paredes celulares	Maceração em cadinho congelado com auxílio de um pilão também congelado	Maceração em cadinho congelado com auxílio de um pilão também congelado	Maceração em cadinho congelado com auxílio de um pilão também congelado
Rompimento de membranas celulares e exposição do conteúdo celular	Tampão (50ml): 2% CTAB; 1,4 M NaCl; 100 mM de Tris-HCL pH 8,0; 20 mM de EDTA; 1% de PVP 1% de β-mercaptoetanol H ₂ O para completar	Tampão (50ml): 2% CTAB; 1,4 M de NaCl; 100 mM de Tris-HCL pH 8,0; 20 mM de EDTA 0,2% de β-mercaptoetanol H ₂ O para completar	Tampão (50ml): 2% CTAB; 1,4 M de NaCl; 100 mM de Tris-HCL pH 8,0; 20 mM de EDTA 1% de PVP 1% de β-mercaptoetanol 1% de tween H ₂ O para completar
Digestão de proteínas	Vortequizar o tecido macerado em 3 ml de tampão de extração por 30 segundos e incubar a 65°C por 1 hora, homogeneizando por inversão a cada 15 minutos. Adicionar 500 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm. Remover o máximo de sobrenadante possível para um novo tubo e adicionar 100 µl de CTAB 5%, homogeneizando por inversão. Adicionar 700 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e centrifugar por 10 minutos. Remover o máximo de sobrenadante possível para novo tubo.	Adicionar 3 ml de tampão de extração ao macerado e homogeneizar. Incubar a 65°C, por 1 hora, agitando a cada 10 minutos. Adicionar 2,5 µl de Proteinase K (50 µg/ml) e incubar a 50°C overnight. Adicionar 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e agitar o tubo manualmente, por 10 minutos. Centrifugar por 10 minutos a 11.000 rpm. Transferir o sobrenadante para novo tubo. Opcionalmente adicionar 10 µl de RNase A (100 µg/mL) e incubar a 37°C, por 30 minutos.	Adicionar 600 µl ao macerado e homogeneizar. Em seguida, incubar em banho-maria a 65°C por 1 hora, após este tempo manter em temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionar 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e agitar por 10 minutos. Centrifugar a 11.000 rpm por 6 minutos, recuperar o sobrenadante e, com ele, repetir o processo de digestão.
Precipitação do DNA	Adicionar v/v de Isopropanol. Homogeneizar por inversão suave e incubar a -20°C por 1 hora. Centrifugar por 5 minutos a 10.000 rpm. Descartar o sobrenadante.	Adicionar 0,6 volume de isopropanol gelado e misturar suavemente por inversão do tubo, várias vezes. Centrifugar a amostra por 20 minutos a 10.000 rpm e descartar o sobrenadante.	Adicionar 500 µL de isopropanol e homogeneizar a solução por 5 minutos, incubando a -20°C por 30 minutos. Em seguida, centrifugar a 11.000 rpm por 10 minutos e descartar o sobrenadante.
Lavagem do DNA	Adicionar 1 ml de etanol 70%. Centrifugar por 5 minutos a 10.000 rpm. Secar o pellet a 37°C por 10 minutos.	Lavar o precipitado com aproximadamente 1 mL de etanol 70%. Centrifugar por 3 minutos a 10.000 rpm. Secar o precipitado, deixando o tubo invertido em papel-toalha.	As etapas de lavagem do DNA, degradação de RNA e re-precipitação são diferentes dos protocolos anteriores e ocorrem da seguinte forma: Ressuspender em 50 µL de H ₂ O ultrapura e adicionar 110 µL de solução de acetato de amônio 7,5 M e homogeneizar, centrifugar a 11.000 rpm por 10 minutos. Recuperar o sobrenadante e adicionar 750 µL de etanol absoluto gelado. Incubar a -20°C por 2 horas, centrifugar a 11.000 rpm por 10 minutos. Lavar o precipitado com 500 µL de etanol 70%, centrifugar a 11.000 rpm por 10 minutos e lavar novamente. Secar o pellet ao ar livre.
Degradação RNA	Dissolver o DNA em 100 µl de H ₂ O ultrapura. Adicionar 10 µl de RNase A (100 µg/mL) e incubar a 37°C por 30 minutos.	A etapa de degradação do RNA ocorre junto com a digestão de proteínas neste protocolo.	
Re-precipitação DNA	Adicionar 100 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm. Transferir o sobrenadante para novo tubo e adicionar v/v de isopropanol gelado e incubar a -20°C por 1 hora. Centrifugar por 5 minutos a 10.000 rpm e secar a 37°C por 10 minutos.		
Preparo da solução estoque	Dissolver o pellet em 100 µl de H ₂ O ultrapura.	Dissolver o precipitado em 50 µL de H ₂ O ultrapura e incubar a 4°C, por meia hora ou mais, antes de armazenar a -20°C.	Após seco ressuspender em 50 µL de H ₂ O ultrapura. Armazenar a -20°C.

Foi testado um primer de ISSR (UBC811) obtido da *Universidade de British Columbia* (UBC set nº 9) para amplificação inicial via PCR. As reações de amplificação

foram realizadas com o volume final de 25 μ l constituído por 1x de buffer, dNTP's (200 μ M), 2 μ M do primer, Taq DNA polimerase (2,5U) (Sigma-aldrich) e 3 μ l de DNA genômico de *M. dubia*.

As condições de temperatura do termociclador foram: 3 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 94°C a 1 minuto, 53,4°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, seguida de 1 ciclo a 72°C por 7 minutos para extensão final. A reação de amplificação foi realizada em termociclador GenCycler (Biosystems).

Os produtos da amplificação foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com Blue Green Loading Dye I (1:10) submetidos a eletroforese por 2 horas e 30 minutos a 5V/cm. A observação das amostras foram realizadas com excitação por luz ultravioleta e através do registro fotográfico pelo fotodocumentador digital EasyDoc 200.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três protocolos baseados no método CTAB e o kit comercial apresentaram resultados diferentes para o isolamento de DNA de *M. dubia* na primeira etapa dos testes. O protocolo de GOMEZ et al. (2012) e de DOYLE & DOYLE (1987) adaptado pela Embrapa-RR apresentaram os resultados mais satisfatórios, similares ao kit comercial, com concentrações que variaram de 268 ng/ μ l a 4095,76 ng/ μ l (Tabela 2). A razão de pureza estava dentro do esperado com médias de 1,82 e 2,12, respectivamente. A análise visual através da eletroforese complementou os dados obtidos pelo espectrofotômetro (Figura 1).

Quando comparou-se cada protocolo de forma separada notou-se que o protocolo de DOYLE & DOYLE (1987) adaptado pela Embrapa-RR permitiu a obtenção de um DNA em maior quantidade. Durante o procedimento de extração foi observado um precipitado bem translúcido evidenciando a ausência de contaminação por polifenóis. Em contrapartida, o protocolo de GOMEZ et al. (2012) apresentou uma boa razão de pureza porém na análise visual fica evidente que o DNA ainda está contaminado com outros compostos.

Apesar do protocolo de PAIVA et al. (2014) já estar bem adaptado para o LaBMol-UFRR e ser eficiente na extração de diversas espécies vegetais ele não apresentou resultados desejáveis para extração de camu-camu, com média de 1,2 para o grau de pureza e baixa concentração (53,40 ng/ μ l). Embora a maioria dos protocolos incorporem a proteinase K para digestão das proteínas sua adição tem afetado negativamente o produto da extração, produzindo bandas tênues e estreitas, além da degradação completa do DNA de algumas amostras (SHI et al., 2004; SILVA et al., 2015), o que pode ter afetado a eficiência deste protocolo. De acordo com SILVA et al. (2013) a qualidade do DNA obtido é suscetível a

concentração de proteinase K e ao tempo de incubação em banho-maria, podendo afetar negativamente o processo de extração.

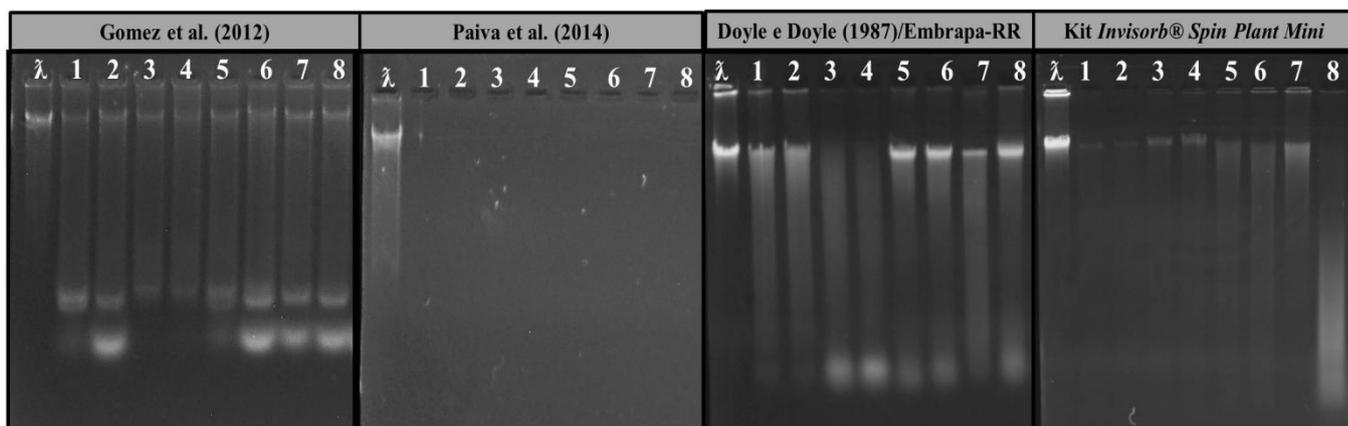
Tabela 2 – Valores de concentração e pureza das amostras extraídas por cada protocolo.

Protocolo	Amostras	Razão (260/280)	Concentração (ng/μl)
Paiva et al. (2014)	1	1,09	66,57
	2	1,25	36,35
	3	1,33	52,93
	4	1,38	57,77
Média		1,2	53,40
Gomez et al. (2012)	1	1,75	448,22
	2	1,86	268,57
	3	1,95	374,64
	4	1,75	508,35
Média		1,82	399,94
Doyle e Doyle (1987) adaptado	1	1,99	1348,68
	2	2,06	1496,89
	3	2,35	4095,76
	4	2,08	411,13
Média		2,12	1838,11
Kit Invisorb® Spin Plant Mini	1	2,24	170,19
	2	2,22	282,99
	3	2,07	315,15
	4	2,06	682,68
Média		2,14	362,75

A associação de PVP (polivinilpirrolidona) e β-mercaptoetanol no tampão de extração auxiliaram no processo de isolamento do DNA. O PVP é utilizado por formar um complexo com polifenóis através de ligações de hidrogênio, permitindo sua remoção das amostras antes que oxidem irreversivelmente a molécula de DNA (MALIYAKAL, 1992). O agente redutor β-mercaptoetanol inibe a atividade de polifenóis, atua na remoção dos resíduos celulares e na precipitação das proteínas por centrifugação (ROMANO & BRASILEIRO, 1999). A eficiência dessas duas substâncias em conjunto em concentrações que variam de 0,2

a 2% de β -mercaptoetanol e de 1 a 2% de PVP, foi relatada por SILVA, 2010; SILVA et al., 2015; ARRUDA et al., 2017.

Figura 1 – Análise eletroforética do DNA genômico de *M. dubia* extraído através de três protocolos manuais e um kit comercial. λ = Dna Lambda (10ng/ μ l). De 1 a 8 amostras de *M. dubia*.



Nos resultados da segunda etapa dos testes, após modificações nos protocolos de DOYLE & DOYLE (1987) adaptado pela Embrapa-RR e o de GOMEZ et al. (2012) descritos na Tabela 3, notou-se que o armazenamento da folha congelada foi eficiente para o processo de extração de DNA de camu-camu em ambos os protocolos (Figura 2). A maior parte dos protocolos descritos na literatura utiliza o nitrogênio líquido durante a maceração devido ao rápido congelamento do tecido vegetal, evitando a degradação do DNA das amostras. O intuito de macerar o tecido foliar é facilitar o rompimento das paredes e membranas celulares do tecido e a separação e exposição do material genético (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os protocolos testados já haviam sido modificados pelos autores que excluíram o uso do nitrogênio líquido, apenas o protocolo de DOYLE & DOYLE (1987) adaptado pelo Embrapa-RR foi modificado nesta pesquisa em relação a esse passo. Para extração de DNA de *M. dubia*, conservar a folha a -80°C por no mínimo 24hrs e macerar em cadinho e pistilo congelados é a melhor alternativa, pois possivelmente ao diminuir a temperatura ocorre a inibição da atividade de alguns compostos fenólicos que podem degradar o DNA no momento da extração.

As modificações permitiram diminuir o tempo total de cada método, eliminar o RNA das amostras, diminuir o arraste vertical no gel e aumentar a quantidade de DNA extraído em ambos os protocolos.

De acordo com FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1998) usando-se os procedimentos do método CTAB, foi possível obter concentrações de 10 a 200 ng/ μ L a partir

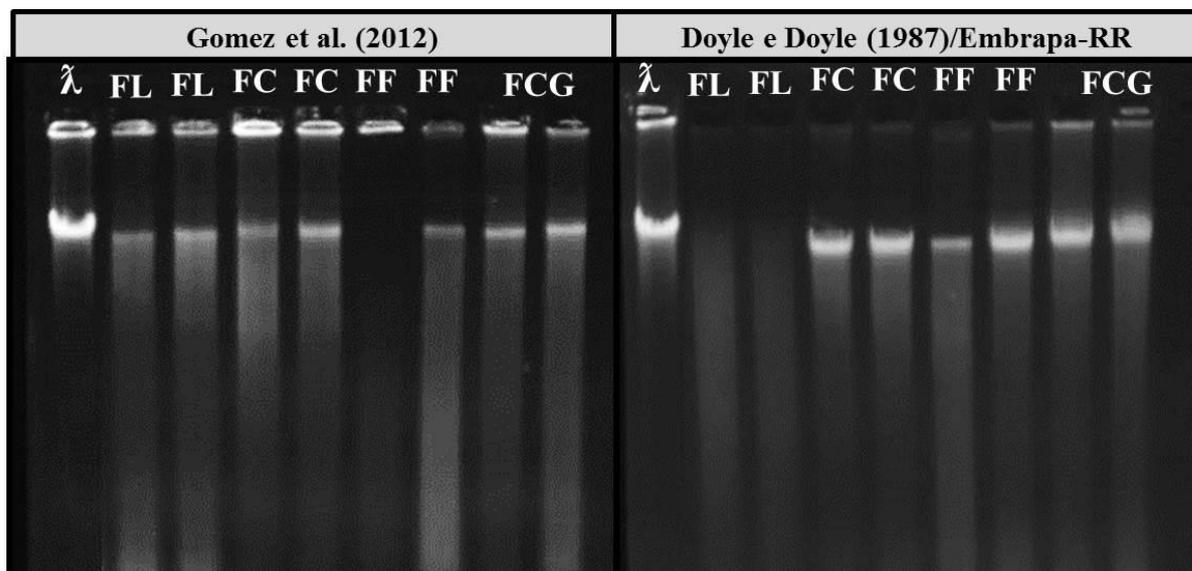
de 50 a 200 mg de tecido foliar. Neste trabalho obtivemos uma média de 1071,88 ng/ μ l a partir de 150 mg de folha. A razão de pureza também estava dentro do esperado com média de 2,0.

Tabela 3 – Modificações nos protocolos selecionados para extração de DNA de camu-camu.

Modificações	
Doyle e Doyle (1987)/Embrapa-RR	Gomez et al. (2012)
1. Aumento da quantidade de material utilizado de 50mg para 150mg;	1. Aumento da quantidade de material utilizado de 50mg para 150mg;
2. Aumento da quantidade de tampão de extração de 1mL para 1,5mL;	2. Aumento da quantidade de tampão de extração de 1mL para 1,5mL;
3. Adição do passo de RNase após a digestão de proteínas;	3. Diminuição da velocidade de 15.000rpm para 12.000rpm;
4. Aumento do tempo de incubação no -20°C para 1h.	4. Adição do passo de RNase após a digestão de proteínas;
	5. Exclusão do passo de re-precipitação do DNA.

Apesar das amostras de folhas liofilizadas extraídas com o protocolo de DOYLE & DOYLE (1987) adaptado pela Embrapa e LabMol-UFRR não terem apresentado bandas no gel de agarose, através do espectrofotômetro constatamos a presença de material genético pelo valor de concentração de 1737,11 ng/ μ l de DNA e uma pureza de 2,0.

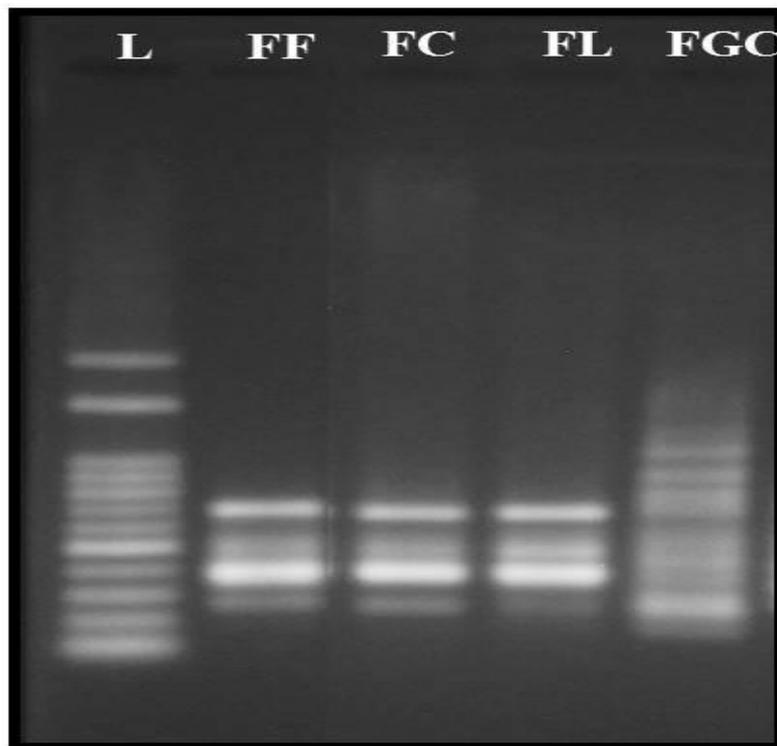
Figura 2 – Extração de DNA de folhas de *M. dubia* armazenadas de diferentes formas. λ = DNA lambda (10ng/ μ l). FL = folha liofilizada. FC = Folha congelada a -80°C. FF = folha fresca. FGC = folha de goiaba congelada.



Finalmente, no teste realizado com o iniciador ISSR (inter simple sequence repeat) UBC 811, as alíquotas de cada tipo de armazenamento que apresentaram melhor qualidade foram submetidas ao processo de amplificação (Figura 3).

A integridade do DNA é de fundamental importância para uma boa reprodutibilidade dos produtos de amplificação dos marcadores moleculares. Porém a quantidade de contaminantes presentes no material extraído pode inviabilizar a obtenção de padrões nítidos e reprodutíveis por meio da PCR (FALEIRO et al., 2003). Neste estudo, todas as amostras apresentaram um resultado satisfatório, demonstrando um padrão de amplificação similar para as três formas de armazenamento.

Figura 3 – Comparação dos produtos de amplificação de DNA genômico de folhas de camu-camu armazenadas de diferentes formas. L = Marcador de peso molecular de 100pb (Ludwig). FL = folha liofilizada. FC = folha congelada. FF = folha fresca. FGC = folha de goiaba congelada.



CONCLUSÃO

As adaptações nos processos permitiram estabelecer um protocolo de extração de DNA para o camu-camu de acordo com as condições de trabalho apresentadas em Roraima, sendo selecionado o protocolo de DOYLE & DOYLE adaptado (Tabela 4) para ser utilizado nos trabalhos com a espécie. Ressaltamos que em locais onde a biodiversidade é mais

conservada geralmente o acesso é mais difícil e sem a infraestrutura adequada para a manutenção da qualidade das amostras. Essas alterações possibilitaram minimizar esses efeitos e garantir o crescimento das futuras pesquisas nesta área.

Tabela 4 – Protocolo de extração de DNA de camu-camu.

Protocolo de extração de DNA de camu-camu – LabMol/PRONAT/UFRR	
Etapas	Procedimentos
Material vegetal	Pesar aproximadamente 150mg de folhas jovens e congelar a -80º C;
Rompimento de paredes celulares	Maceração em cadinho congelado com auxílio de um pilão também congelado;
Rompimento de membranas celulares e exposição do conteúdo celular	Tampão (50ml): 2% CTAB; 1,4 M de NaCl; 100 mM de Tris-HCL pH 8,0; 20 mM de EDTA 1% de PVP 1% de β-mercaptoetanol 1% de tween H ₂ O para completar
Digestão de proteínas	Adicionar 1500 µl ao macerado e homogeneizar. Em seguida, incubar em banho-maria a 65°C por 1 hora, após este tempo manter em temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionar 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e homogeneizar por inversão suave por 10 minutos. Centrifugar a 11.000 rpm por 6 minutos, recuperar o sobrenadante e, com ele, repetir o processo de digestão;
Degradação do RNA	Adicionar 10µl de RNase A (10mg/ml) e incubar por 30 minutos a 37º C;
Precipitação do DNA	Adicionar 500 µL de isopropanol e homogeneizar por inversão suave a solução por 5 minutos, incubando a -20°C por 1 hora. Em seguida, centrifugar a 11.000 rpm por 10 minutos e descartar o sobrenadante.
Lavagem do DNA	Ressuspender em 50 µL de H ₂ O ultrapura e adicionar 110 µL de solução de acetato de amônio 7,5 M e homogeneizar por inversão suave, centrifugar a 11.000 rpm por 10 minutos. Recuperar o sobrenadante e adicionar 750 µL de etanol absoluto gelado. Incubar a -20°C por 2 horas, centrifugar a 11.000 rpm por 10 minutos. Lavar o precipitado com 500 µL de etanol 70%, centrifugar a 11.000 rpm por 10 minutos e lavar novamente. Secar o pellet ao ar livre.
Preparo da solução estoque	Após seco ressuspender em 50 µL de H ₂ O ultrapura. Incubar a 4º C por 12 horas e posteriormente armazenar a -20°C.

REFERÊNCIAS

- ARBI, G. et al. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from *Allium roseum* L. (Alliaceae). **Afr. J. Biotechn**, 2010.
- ARRUDA, S. R.; PEREIRA, D. G.; SILVA-CASTRO, M. M.; BRITO, M.G.; WALDSCHMIDT, A. M. An optimized protocol for DNA extraction in plants with a high content of secondary metabolites, based on leaves of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Leguminosae). **Genetics and Molecular Research**, v.16, n.3, p. 1-9, 2017.
- BARDALES, A. E. M.; PISCO, E. G. C.; FLORES, A. J. F.; MASHACURI, N. R.; RUIZ, M. C.; CORREA, S. A. I.; GÓMEZ, J. C. C. Semillas e plántulas de *Myrciaria dubia* ‘camu-camu’: biometría, germinación y crecimiento inicial. **Scientia Agropecuária**. v.5, n.2, p.85-92, 2014.

CHAGAS, E. A.; BACELAR-LIMA, C. G.; CARVALHO, A. dos S.; RIBEIRO, M. I. G.; SAKAZAKI, R. T.; NEVES, L. C. Propagação do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh). **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 6, n. 1, p. 67-73, 2012.

CHAGAS, E. A.; LOZANO, R. M. B.; CHAGAS, P. C.; BACELAR-LIMA, C. G.; GARCIA, M. I.; OLIVEIRA, J. V.; SOUZA, O. M.; MORAIS, B. S.; ARAÚJO, M. C. R. Intraspecific variability of camu-camu fruit in native populations of northern Amazonia. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 265-271, 2015.

CORREA, S. I.; FREYRE, S. P.; ALDANA, M. M. Caracterización morfológica y evaluación de la colección nacional de germoplasma de camu camu *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh, del INIA Loreto-Perú. **Scientia Agropecuaria**, v.2, n.4, p. 189-201, 2011.

COSTA, M.R.; MOURA, E.F. **Manual de extração de DNA**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 24p. 2001.

DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z.; BITTENCOURT, J. V. M.; CITADIN, I.; SACHET, M. R. Proposta de Protocolo para Extração de DNA de Jabuticabeira. **Ciência Florestal**, v. 21, n.2, p. 363-367, 2011.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**. v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.

FALEIRO, F. G.; FALEIRO, A. S. G.; CORDEIRO, M. C. R.; KARIA, C. T. **Comunicado Técnico 92: Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 6p. 2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília:EMBRAPA-CENARGEN, 220p. 1998.

GARCÍA-DÁVILA, C.; CORAZÓN-GUIVIN, M. A.; CASTRO-RUIZ, D.; CHOTAMACUYAMA, W.; RODRIGUEZ-DEL CASTILLO, A. M.; DELGADO-VASQUEZ, C.; RENNO, J. F. Variabilidad genética de cinco poblaciones naturales de Camu- camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc. Vaugh) de la Amazonía Peruana, evaluadas mediante DALP. **Folia Amazónica**, v. 17, n.1-2, p. 91-98, 2008.

GOMEZ, J. C. C.; RUIZ, M. C.; SAAVEDRA, R. R.; CORREA, S. I. Aislamiento de ADN genómico de *Myrciaria dubia* (HBK) “camu camu” apropiado para análisis moleculares. **Ciencia Amazónica**, v. 2, n.1, p. 7-16, 2012.

GRIGIO, M. L.; CHAGAS, E. A.; BALA, R.; CHAGAS, P. C.; SILVA, A. R. V.; SOBRAL, S. T M; OLIVEIRA, R. R. Qualitative evaluation and biocompounds present in different parts of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit. **African Journal of Food Science**, v.11, n.5, 124-129, 2017.

GRUTZMACHER, D. D.; ZIMMER, P. D.; OLIVEIRA, A. C.; LOECK, A. E.; FISHER, S.; ELIAS, S. A.; VARGAS, C. C. J. Comparação de protocolos para extração de DNA de *Acromyrmex heyeri*. **Revista Brasileira Agrociência**, v.8 n.2, p. 165-167, 2002.

MALIYAKAL, E. J. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. **Nucleic Acids Research**, v.20, n.9, p.2381, 1992.

PAIVA, R. M. S.; PACOBAHYBA, L. D.; ANTUNES, F.; GRANJA, F. Nota técnica sobre modificações na metodologia de extração para obtenção do material genético de macrófitas

aquáticas das grades do PPBio do estado de Roraima. **Boletim do Museu Integrado de Roraima**, v. 8, n.2, p. 68-74, 2014.

PANDURO, M. P.; LINARES, C.; MENDOZA, H.; ANGUIZ, R. **Plan de mejoramiento genético de camu camu**. Iquitos: Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana, 52p. 2004.

RIBEIRO, A. P. F.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, E. B.; MENDONÇA, A. C.; SANT'ANA, H. M. P. Teor de vitamina C, β -caroteno e minerais em camu-camu cultivado em diferentes ambientes. **Ciência Rural**, v.46, n. 3, p.567-572, 2016.

ROJAS, S.; CLEMENT, C.; YUYAMA, K. NAGAO, E. O. Diversidade genética em acessos do banco de germoplasma de camu-camu (*Myrciaria dubia* [H.B.K.] McVaugh) do INPA usando marcadores microssatélites (EST-SSR). **Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 12, n.1, p. 51-64, 2011.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.9, p. 40-43, 1999.

SCHMITT, K. F. M.; SILVA, B. M.; ROSSI, A. P.; SANDER, N.; SILVA, C. J. Estabelecimento e otimização de protocolo para extração e amplificação de DNA em tecido foliar de *Curcuma longa* (L.). **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 1560 - 1568, 2014.

SHI, S.R.; DATAR, R; LIU, C; WU, L; ZHANG, Z.; COTE, R. J.; TAYLOR, C. R. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat--induced retrieval in alkaline solution. **Histochem Cell Biology**, v.122, n.3, p. 211-8, 2004.

SILVA, A. Z. C.; COSTA, R. B.; CAMPOS, T. S. Comparação de três tampões para extração de DNA genômico de tecidos foliares de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. **Multitemas**, v. 20, n.48, p. 179-193, 2015.

SILVA, L. A.; SILVA, D. B. S.; CRISPIM, B. A.; VAINI, J. O.; GRISOLIA, A. B.; SENO, L. O. Variação de concentração de proteinase k em protocolos de extração de DNA de bovino. **Archives of Veterinary Science**, v.18, n.2, p.15-19, 2013.

SILVA, M. N. da. Extração de DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do cerrado. **Revista Árvore**, v. 34, n.6, p. 973-978, 2010.

CHAPTER II - VARIABILITY OF *MYRCIARIA DUBIA* GENOTYPES (MYRTACEAE) IN THE GEOGRAPHIC GRADIENT OF THE NORTHERN AMAZON RAINFOREST¹

ABSTRACT

Myrciaria dubia (Kunth) McVaugh (Myrtaceae) is a native species of the Amazon Rainforest that has been attracting attention worldwide and arousing great interest of the food and pharmacological industries due to the high concentrations of ascorbic acid in its fruits. Characterizing different materials of *M. dubia* by means of molecular markers allows the integration of agronomic and molecular information in search of more promising individuals of this species. In this sense, the objective of the research was to characterize the genetic variability of 55 sub-samples of this species present in the Embrapa Roraima Germplasm Collection through ISSR initiators. The five initiators tested generated a total of 64 fragments, with a 98.3% polymorphism rate. The greatest genetic variation was expressed within the populations (66.6%), while the lowest divergence was determined among the populations (33.4%) of the collection. The Mantel test scored a correlation between genetic and geographical distances ($r = 0.3\%$ and $P = 0.01$). The analysis by the UPGMA method allowed the formation of four subgroups suggesting that the AT08, AB08, AT13, BQ28, EV10, LR12 and IAB01 individuals are genetically divergent and can be targeted to genetic breeding programs because they accumulate high variation.

Keywords: ISSR Markers; Camu-camu. Roraima; Genetic Variability.

¹ Artigo submetido a revista Genetics and Molecular Biology.

CAPITULO II – VARIABILIDADE DE GENÓTIPOS DE *Myrciaria dubia* (MYRTACEAE) EM GRADIENTE GEOGRÁFICO DO NORTE DA AMAZÔNIA BRASILEIRA

RESUMO

Myrciaria dubia (Kunth) McVaugh (Myrtaceae) é uma espécie nativa da Amazônia que vem se destacando mundialmente e, despertando grande interesse das indústrias alimentícias e farmacológicas em função das altas concentrações de ácido ascórbico em seus frutos. Caracterizar diferentes materiais de trabalho de *M. dubia* por meio de marcadores moleculares possibilita a integração de informações agronômicas e moleculares em busca de indivíduos mais promissores dessa espécie. Nesse sentido, o objetivo da pesquisa foi caracterizar a variabilidade genética de 55 subamostras dessa espécie presentes na Coleção de Germoplasma da Embrapa Roraima por meio de iniciadores ISSR. Os cinco iniciadores testados geraram um total de 64 fragmentos, com 98,3% de polimorfismo. A maior variação genética foi expressa dentro das populações (66,6%), enquanto a menor divergência foi determinada entre as populações (33,4%) da coleção. O teste de Mantel pontuou correlação entre as distâncias genéticas e geográficas ($r= 0,3\%$ e $P= 0,01$). A análise pelo método UPGMA possibilitou a formação de quatro subgrupos sugerindo que os indivíduos AT08, AB08, AT13, BQ28, EV10, LR12 e IAB01 são divergentes geneticamente e podem ser direcionados para programas de melhoramento genético por acumularem alta variação.

Palavras-chave: Marcadores ISSR. Camu-camu. Roraima. Variabilidade genética.

INTRODUCTION

Myrciaria dubia (Kunth) McVaugh (Myrtaceae) is native of South America, occurring in the flooding margins of the water bodies of Peru, Guyana, Colombia, Venezuela and Brazil (YUYAMA, 2011; PANDURO et al., 2017). As the largest known source of vitamin C (3 to 8g in 100g pulp⁻¹) in the Amazon and compounds with antioxidant activity is widely used in the northern region, with a high commercial potential (SUGUINO et al., 2001). Its lyophilized pulp is mainly marketed to Europe, Japan and the United States, generating food, pharmacological and cosmetic products (PANDURO et al., 2004; AKTER et al., 2011). However, although the species has several positive characteristics, it is in the process of domestication.

Knowledge of genetic distances is an important step for species of commercial interest and in the process of domestication such as *M. dubia*. Depending on the distribution of genetic variability, strategies can be defined for *in situ* conservation of populations with greater variation, selection of mother plants for implantation and supplementation of *ex situ* collections, as well as identification of the existence of gene flow (NEGREIROS et al., 2008).

In the northern Amazon, studies with morphological and agronomic markers have been performed for the implantation and establishment of *M. dubia* collections, through the analysis of vegetative, reproductive and chemical characters (CHAGAS et al., 2015; LOZANO et al., 2016; PANDURO et al., 2017). However, information generated through molecular markers is scarce. A tool to study the genetic variability of *M. dubia* is the use of microsatellite markers, such as ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), as they determine the genetic distances allowing access to the genotype without influence of environmental conditions, as well as to verify the patterns of distribution of genetic variability within and between populations, and the existence of a possible gene flow between them (GONZALES and AGUIRRE, 2007; PADMESH et al., 2012). Therefore, the present study evaluated the genetic structure within and among 11 populations of *M. dubia* dispersed along the Rio Branco river basin, with the use of ISSR markers.

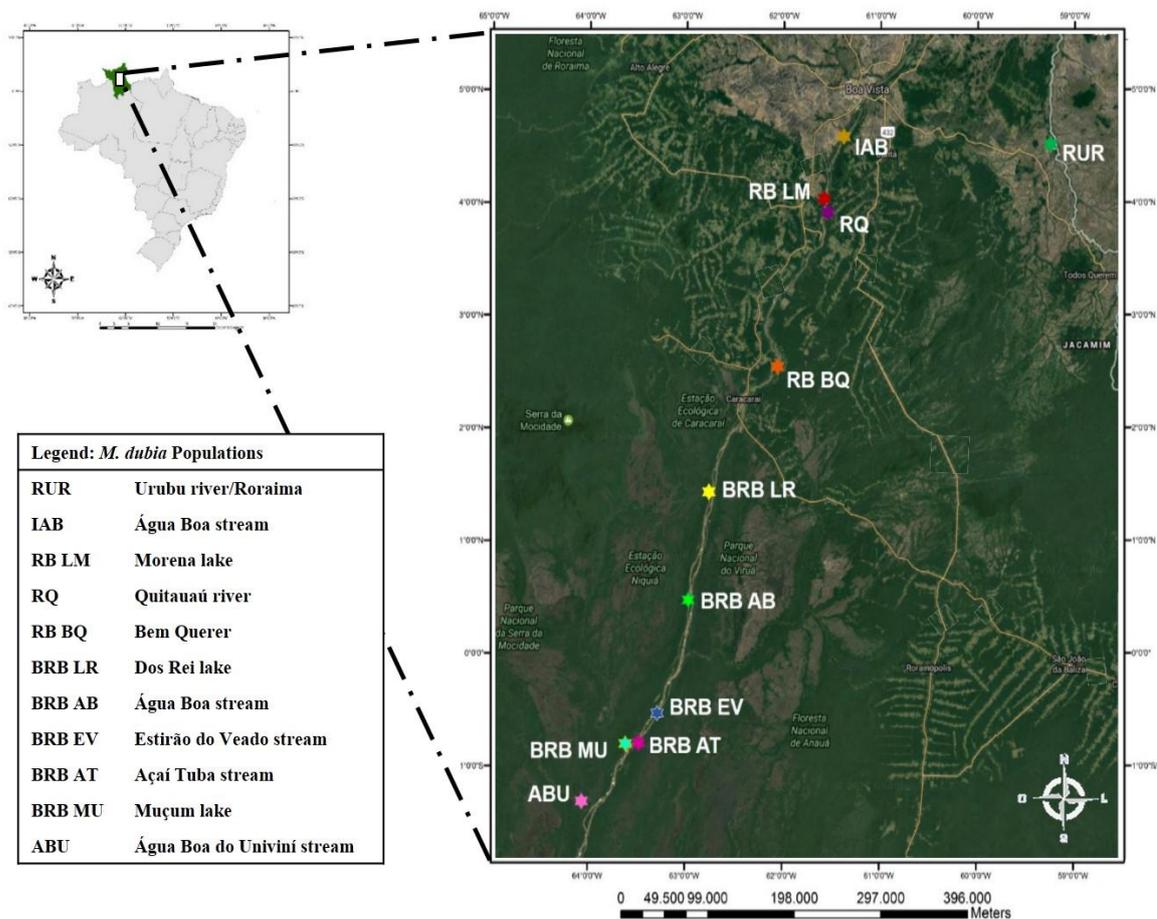
MATERIAL AND METHODS

Study area: The hydrographic basin of the Rio Branco river is located in the extreme north of Brazil, between the border areas of Venezuela and Guiana. The basin is the main drainage system of the state of Roraima, occupying around 83% of its territory (187 Km² being a sub-basin of the Negro river, which is a part of the big Amazon System rivers.

The Rio Branco basin is formed by the confluence of the rivers Tacuatu and Uraricoera, cutting almost the entire extension of Roraima in the north-south Direction. Its Waters are classified as White because of the concentration of sediments in the period of largest rainfall incidence (IBGE, 1996).

Sampling: The genotypes of *M. dubia* used in this study are located at the Serra da Prata Experimental Field, Embrapa Roraima, located at Vicinal da Pratinha, km 07, Mucajaí municipality (02° 22 '36 "N, 60° 59' 48.5" O). The populations were collected through cuttings along the Rio Branco basin (Figure 1) and implanted in the field by Chagas et al. (2015), composing the Germplasm Collection of the species. Each one received a code with the abbreviation of the name of the river or stream of origin, defining the populations under study (Table 1). From this material, genetic variability information was generated based on ISSR markers and correlated with the geographic distances of the populations.

Figure 1 - Geographic location of the 11 different populations of *M. dubia* throughout the Rio Branco basin, Roraima state.



Extraction of DNA from the *M. dubia*: For the extraction of the DNA were collected young leaves of each subsamples. After the collection, the leaves were stored in paper bags previously identified and transported in a thermal box with ice. In the laboratory, the material was stored in a freezer at -80°C until extraction. DNA isolation was performed following the method of Paiva-Rodrigues et al. (*in press*) described for *M. dubia*. The quality and quantity of DNA present in the samples was analyzed by a 0.8% agarose gel electrophoresis and by spectrophotometry in the CIRRUS 80 MB (FEMTO) apparatus.

Table 1 - Populations of *M. dubia* prospected at the state of Roraima, according to geographic coordinates.

Identification of the population	Water body of origin	Number of subsamples	Geographic coordinates
BRB AB	Água Boa stream / Branco river	5	1°9'52,56"N 61°20'21,90"W
BRB ABU	Água Boa do Univini river	2	0°30'0"N 61°45'0"W
BRB AT	Açaí Tuba stream	5	0°41'22,26"N 61°31'58,56"W
RB BQ	Bem Querer/ Branco river	9	1°55'16,86"N 61°0'26,10"W
BRB EV	Estirão do Veado stream	4	0°47'10,86"N 61°27'11,46"W
IAB	Água Boa stream / Mucajaí river	6	2°40'1,30"N 60°45'57,11"W
RB LM	Morena lake	8	2°27'27,30"N 60°50'0,84"W
BRB LR	Dos Rei lake	5	1°30'10,44"N 61°15'44,64"W
BRB MU	Muçum lake	3	0°41'17,10"N 61°34'2,82"W
RQ	Quitauau river	3	2°25'44,22"N 60°45'57,11"W
RUR	Urubu river	5	2°12'28,73"N 60°2'28,62"W

Amplification of the extracted fragments: For the molecular variability analysis, were used initiators UBC 811, UBC 812, UBC 817, UBC 868 and UBC 880 by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. Amplification reactions were performed with the final volume of 25 μl , consisting of approximately 80 ng of genomic DNA, 2.0 μM of each initiator, 1X Reaction Buffer (pH 8.5), 1.0 mM MgCl_2 , 1, 0 mM dNTPs and 0.75 U of Taq Hot Start Polymerase (Promega). The annealing temperatures varied from 50 to 60 $^{\circ}\text{C}$.

The amplification reaction was performed in a GenCycler thermocycler (BYOSISTEMS) and its products were submitted to 1.5% agarose gel electrophoresis. Gels were visualized by excitation under ultraviolet light (302 nm) and documented by EasyDoc 200 digital photo documentator.

Data analysis: From the amplified bands, a binary matrix (absence = 0 / presence = 1) was constructed by observing the number and percentage of polymorphic bands per initiator, thus determining the amount of polymorphic locus. The generated matrix was used as the basis for the analysis through the Computational Program in Genetics and Statistics GENES version 2017.3.25 (CRUZ, 2006).

The minimum number of tags required to obtain stable associations between the subsamples was estimated through *bootstrap* analysis. The genetic similarity for each pair of individuals was carried out using resamples of different sizes with 10,000 permutations, performed with the aid of the Genetics and Statistics Computational Program GENES (CRUZ, 2006).

The distribution of genetic variability among and within the subsamples populations was estimated through Molecular Variance Analysis (AMOVA) based on the method of Excoffier et al. (1992), carried out with the help of the Computational Program in Genetics and Statistics GENES, version 2017.3.25 (CRUZ, 2006). The distance matrix was used for cluster analysis using a hierarchical method by the UPGMA technique. To verify the consistency of the clusters, 1,000 permutations were used. The coefficient of cophenetic correlation (r) was also calculated to verify the adequacy of the cluster pattern of the accessions. The consistency of the nodes and bifurcations was obtained from the bootstrap technique, with the aid of the Genetics and Statistics Computational Program GENES, version 2017.3.25 (CRUZ, 2006).

To verify if there is any correlation between the geographic distances and the genetic distances estimated by the Nei and Li coefficient (1979), the Mantel test with 10,000 permutations was used by the statistical program R version 2017.3.4.0 using the vegan data package.

RESULTS

From the tags obtained on the gel a total of 64 fragments were generated using 5 ISSR initiators (Table 2).

Table 2 - Sequence of initiators with their respective annealing temperatures (TA), number of bands generated (NB), number of polymorphic bands (BP), percentage of polymorphic bands per initiator (% BP), Approximate amplitude (in base pairs) of the amplified fragments (APb).

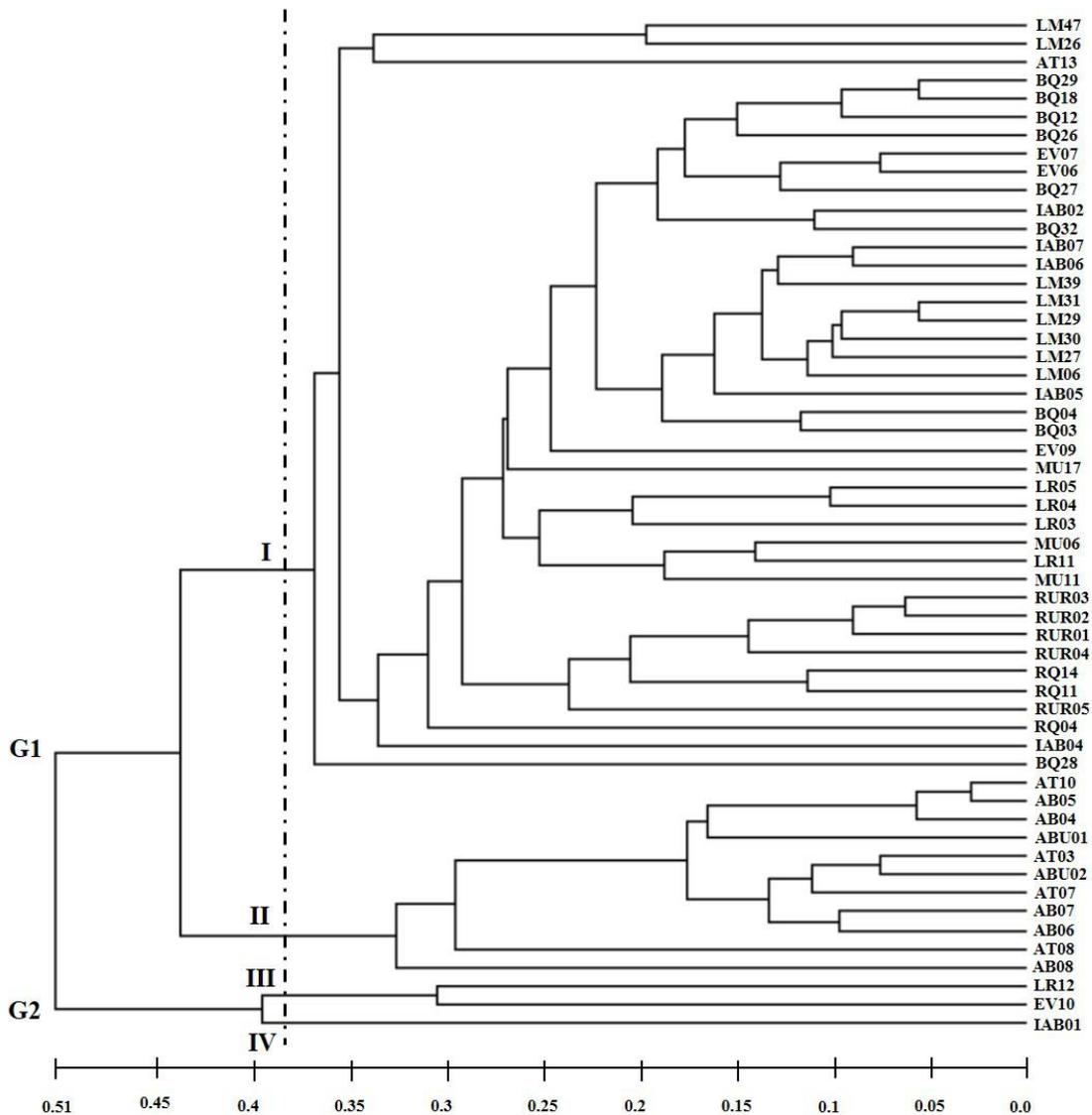
Initiator	Sequence (5' → 3')	T _A (°C)	NB	BP	%BP	APb
UBC 811	(GA) ₈ C	53,4	12	12	100	110 -900
UBC 814	(CT) ₈ ^a	49,8	11	11	100	200 -900
UBC 817	(CA) ₈ ^a	52,2	12	11	91,6	110 - 1600
UBC 868	(GAA) ₆	49,8	16	16	100	250 -1250
UBC 880	(GGAGA) ₃	49,2	13	13	100	150 - 1250
Total	-	-	64	63	98,32	250 -1300

The optimal number of tags occurred with a sample size of 51 fragments, reaching a level higher than 97% correlation. The percentage of polymorphism for all initiators in the 55 sub-samples of *M. dubia* analyzed was 98.3%. The AMOVA indicated that the greatest

genetic variability is expressed among the individuals within the populations (66.6%), and a smaller divergence among the populations (33.4%) of *M. dubia* from the collection with $p = 0.01$.

The UPGMA cluster analysis allowed the separation of the 55 sub-samples of *M. dubia* into two main groups called G1 and G2, with a 86.4% consistency rate and four subgroups (I, II, III and IV) separated by cut point in the dendrogram of 78.22% of observed average distance (Figure 2).

Figure 2- Grouping the 55 sub-samples of *M. dubia* by the UPGMA method from the distance matrix obtained by the complement of the similarity coefficient of Nei and Li (1979).



The subgroup I allocated 41 subsamples, with structuring of part of the accesses from the locations of Bem Querer, Lago da Morena, and Rio Urubu. The subgroup II presented all the subsamples from the locations of Água Boa and Água Boa do Univini and four subsamples of the Acai Tuba. Subgroups III and IV were formed by only two and one

subsample respectively, allocating the most divergent. Subsamples present in the same group are considered genetically closer. The coefficient of cophenetic correlation (CCC) was 86% correlation, 2.8 and 16.7 stress distortion. The correlation coefficient between geographical distances and genetic distances for the 55 sub-samples of *M. dubia* was 0.3 with a significant result of $p = 0.01$.

DISCUSSION

Studies by Goulão and Oliveira (2001) describe that the use of ISSR markers are useful in the identification of cultivars of fruit species that usually present a long juvenile period due to high reproducibility, providing advantages over other methods. The ISSR markers were effective in determining the genetic variability of *M. dubia*, in the same way as in other studies applied to the family Myrtaceae, as described by Oliveira et al. (2014) with *Psidium guajava* L. (guava), Alves et al. (2016) with *Myrcia luidiana* (Sw.) and Cruz et al. (2016) with *Plinia cauliflora* (Brazilian grape tree). This emphasizes that the use of molecular biology techniques in the evaluation of little studied species, such as *M. dubia*, allows the selection of genotypes with greater divergence for new studies of backcrossing of the species in a short period of time (GOIS et al., 2014).

The inter- and intra-population genetic variability was similar to that found by Nunes et al. (2017) when analyzing 10 populations of *M. dubia* from Lago dos Reis, in Roraima, finding greater variability within (65%) than among populations (35%), with the use of 14 ISSR markers. The distribution patterns of genetic variability are highly correlated with the reproductive systems of plants (MARTINS, 1987). It is expected that cross-fertilization and long-lived species accumulate greater genetic variability within populations, with average values of 28% among populations when estimated by analysis of molecular variance based on dominant markers, as emphasized by Nybom and Bartish (2000). Considering that the values of variation among the populations of *M. dubia* were relatively high, of 33%, it is possible to infer that a partial form of self-fertilization occurs for this species, which has already been reported by Bacelar-Lima (2009).

The genotypes AT08, AT13 (Acai Tuba locality), AB08 (Água Boa locality), BQ28 (Corredeira Bem Querere locality), EV10 (Estirão do Veado locality), LR12 (Lago do Rei locality) and IAB01 (Igarapé Água Boa locality) were grouped in an isolated manner, sometimes forming groups of a single individual. This characteristic is indicative of genetically divergent individuals in relation to the other genotypes of their group (GOIS et al., 2014). Such genotypes, which presented greater genetic divergence in this study are also part

of the populations that have been highlighted in relation to the phenotypic characteristics analyzed by Chagas et al. (2015).

The authors concluded that the populations AB (Água Boa locality), AT (Açaí Tuba Locality), EV (Estirão do Veado locality) and LR (Lago do Rei locality) contained the highest levels of ascorbic acid and that BQ populations (Corredeira Bem Querere locality) and IAB (Igarapé Água Boa locality) were the most promising for the average fruit weight. In this way, the crossing of this information indicates that the selection of combined subsamples can generate higher individuals, preserving or accentuating characteristics of agronomic interest, in the same way as pointed out by Nascimento et al. (2014).

The correlation by geographic and genetic distance suggests that there is a gene flow connecting the populations, which implies in the genetic approximation of distinct populations and increase of the genetic variability within the populations (GOIS et al., 2014). The grouping of subsamples from distinct regions, such as the Lago Muçum (MU, Baixo Rio Branco) that was allocated to the subgroup I, together with subsamples from Alto Rio Branco River, Quitauau (RQ) and Rio Urubú (RUR) confirm the existence of gene flow connecting the populations, through the dispersion of their seeds. As the dispersal system of the species occurs in a hydrochoric and zoocorical form, the populations are enriched with migratory flow of seeds carried by the ichthyofauna and the stream (YUYAMA; MENDES; VALENTE, 2011), in this way, the populations share alleles with each other maintaining genetically.

Gene flow, which is one of the evolutionary factors responsible for limiting the speciation process, restricting the effects of genetic drift and natural selection, and therefore divergence among populations through the incorporation of alleles throughout the occurrence of the species (VALVA & COELHO, 1998; NASCIMENTO, 2008). The high genetic variability found in the Working Collection reflects the origin of the subsamples that were derived from natural populations under different ecological conditions. These conditions are a natural feature throughout the Rio Branco basin, where it presents areas of tension represented by the contact between savannahs (lavrado – a type of savannah), forests and campinas / campinaranas (CARVALHO, 2014), each population being adapted to specific environmental conditions of their place of origin.

CONCLUSIONS

The genetic variability among the populations of *M. dubia* that occur along the Rio Branco basin have a low correlation with the geographic distance, due to the mode of dispersion of the species to increase the gene flow among the populations. The analyzes

suggest that the individuals AT08, AB08, AT13, BQ28, EV10, LR12 and IAB01 are the most genetically divergent, enabling them to be targeted to breeding programs because they accumulate high genetic variation, allowing new crosses.

REFERENCES

- AKTER, M. S.; OH, S.; EUN, J. B.; AHMED, M. Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review. **Food Research International**, v.44, n.7, p.1728-1732. 2011.
- ALVES, M. F.; NIZIO, D. A. C.; BRITO, F. A.; SAMPAIO, T. A.; SILVA, A. V. C.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; CARVALHO, S. V. A.; BLANK, A. F. Analysis of genetic diversity of a native population of *Myrcia lundiana* Kiaersk. Plants using *ISSR* markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, p. 1-10, 2016.
- CHAGAS, E. A.; LOZANO, R. M. B.; CHAGAS, P. C.; BACELAR-LIMA, C. G.; GARCIA, M. I.; OLIVEIRA, J. V.; SOUZA, O. M.; MORAIS, B. S.; ARAÚJO, M. C. R. Intraspecific variability of camu-camu fruit in native populations of northern Amazonia. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 265-271, 2015.
- CRUZ, C. D. **Programa GENES: Análise multivariada e simulação**. Viçosa: UFV, 175p. 2006.
- CRUZ, E. S.; DANTAS, A. C. V. L.; CARMO, C. D.; BASTOS, L. P. Molecular characterization of jacobin tree genotypes located in the municipalities of Recôncavo of Bahia. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 38, n. 3, p. 1-9, 2016.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.
- GOIS, I. B. et al. Variabilidade genética em populações naturais de *Ziziphus joazeiro* Mart., por meio de marcadores moleculares RAPD. **Revista Árvore**, v.38, n.4, p.621-630, 2014.
- GONZÁLES, A.; AGUIRRE, X. Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs). In: EGUIARTE, L.; SOUZA, V.; AGUIRRE, X. (Eds.). **Ecologia molecular**. México: Instituto Nacional de Ecología, p. 567-571. 2007.
- GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v.122, n.1, p.81-89, 2001.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Anuário Estatístico do Brasil**. Rio de Janeiro, n. 56, p. 1-11, 1996.
- LOZANO, R. M. B.; CHAGAS, E. A.; SMIRDELE, O.; RODRIGUEZ, C. A.; CHAGAS, P. C.; MOTA FILHO, A. B.; SOUZA, O. M.; CORDEIRO, A. C. C. Genetic Divergence among Camu-Camu Plant Populations Based on the Initial Characteristics of the Plants. **Journal of Agricultural Science**, v. 8, n. 11., p. 51-58, 2016.

- LUZ, G. A.; GOMES, S.O.; ARAUJO NETO, R. B.; NASCIMENTO, M. S. C. B.; LIMA, P. S. Molecular characterization of accessions of *Cratylia argentea* (Camaratuba) using ISSR markers. **Genetic Molecular Research**, v.14, n.4, p.15242-15248, 2015.
- MARTINS, P. S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação “in situ”. **Scientia Forestalis**, v. 35, n. 2, p. 71-78, 1987.
- MENGISTU, F. G.; MOTOIKE, S. Y.; CRUZ, C. D. Molecular Characterization and Genetic Diversity of the Macaw Palm Ex Situ Germplasm Collection Revealed by Microsatellite Markers. **Diversity**, v.8, n.20, p. 1-12, 2016.
- NASCIMENTO, M. A. **Variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) no Estado de Minas Gerais com marcadores ISSR**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural), Universidade Federal de Viçosa, 2008.
- NASCIMENTO, W. M. O. do; GURGEL, F. de L.; BHERING, L. L.; RIBEIRO, O. D.; SOARES, A. C. S. **Avaliações preliminares de parâmetros genéticos de acessos de *Myrciaria dubia* por marcadores fenotípicos**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 27p. 2013.
- NASCIMENTO, W. M.; GURGEL, F. L.; BHERING, L. L.; RIBEIRO, O. D. Pré-melhoramento do camucamuzeiro: estudo de parâmetros genéticos e dissimilaridade. **Revista Ceres**, v. 61, n.4, p. 538-543, 2014
- NEGREIROS, J. R. S.; RODRIGO, S. A.; ÁLVARES, V. S.; BRUCKNER, C. H.; CRUZ, C. D. Divergência genética entre progênies de maracujazeiro-amarelo com base em características das plântulas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 197-201, 2008.
- NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 76, n. 10, p. 5269-5273, 1979.
- NUNES, C. F.; SETOTAW, T. A.; PASQUAL, M.; CHAGAS, E. A.; SANTOS, E. G.; SANTOS, D. N.; LIMA, C. G. B.; CANÇADO, G. M. A. *Myrciaria dubia*, an Amazonian fruit: population structure and its implications for germplasm conservation and genetic improvement. **Genetics and Molecular Research**, v.16, n.1, p. 1-12. 2017.
- NYBOM, H., BARTISH, I. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plant. **Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics**. v. 3, n. 2, p. 93 – 114. 2000.
- OLIVEIRA, N. N. S.; VIANA, A. P.; QUINTAL, S. S. R.; PAIVA, C. L.; MARINHO, C. S. Análise de distância genética entre acessos do gênero *psidium* via marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 4, p.917-923, 2014.
- PADMESH, P.; MUKUNTHAKUMAR, S.; VINEESH, P. S.; SKARIA, R.; HARI KUMAR, K.; KRISHNAN, P. N. Exploring wild genetic resources of *Musa acuminata* Colla distributed in the humid forests of southern Western Ghats of peninsular India using ISSR markers. **Plant Cell Reports**, v. 31, n. 9, p. 1591-1601, 2012.
- PANDURO, M. P.; CHAGAS, E. A.; DAVILA, E. P.; RODRIGUEZ, C. A.; LOZANO, R. B.; CHAGAS, P. C.; MELO, V. F. Selection of Superior Genotypes in 37 Clones of Camu-Camu by Repetitiveness Analysis. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 6. 2017.

- PANDURO, M. P.; LINARES, C.; MENDOZA, H.; ANGUIZ, R. **Plan de mejoramiento genético de camu camu**. Iquitos: Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana, 52p. 2004.
- PINEDO, S.; IMAN, S.; PINEDO, M.; VASQUEZ, A.; COLLAZOS, H. Clonal trial of five genotypes of “camu-camu”, *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc. Vaugh, in non-flooded área. **African Journal of Plant Science**, v. 5, n. 1, p. 40-46. 2011.
- ROJAS, S.; CLEMENT, C.; YUYAMA, K.; NAGAO, E. O. Diversidade genética em acessos do banco de germoplasma de camu-camu (*Myrciaria dubia* [H.B.K.] McVaugh) do INPA usando marcadores microssatélites (EST-SSR). **Revista Corpoica - Ciência y Tecnología Agropecuaria**, v. 12, n. 1, p. 51-64, 2011.
- SILVA, A. V. C.; NASCIMENTO, A. L. S.; VITÓRIA, M. F.; RABBANI, A. R. C.; SOARES, A. N. R.; LEDO, A. S. Diversity and genetic stability in banana genotypes in a breeding program using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. **Genetics and Molecular Research**, v.16, n.1, p. 1-9, 2017.
- SUGUINO, E.; ARAÚJO, P. S. R.; SIMÃO, S. **Cultivo do camu-camu (*Myrciaria dubia*)**. Piracicaba: ESALQ, 37p. 2001.
- VALVA, F. A.; COELHO, A. S. G. Estrutura genética de populações vegetais: estratégias adaptativas no cerrado. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 44, Goiania. **Anais...** Goiania, GO: Sociedade Brasileira de Genética, 1998.
- YUYAMA, K. Melhoramento de camu-camu. In: YUYAMA, K; VALENTE, J. P. (orgs.) **Camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh)**. 1ed. Curitiba, PR: CRV, cap.6. 2011.
- ZANATTA, C. F.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v. 101, n.4, p. 1543–1549, 2007.

CAPITULO III – VARIABILIDADE GENÉTICA E AGRONÔMICA DO CAMU-CAMU DO ESTADO DE RORAIMA

RESUMO

Em Roraima, há grande ocorrência de populações nativas de camu-camu, as quais estão distribuídas em diversas partes do Estado. Essa riqueza, ainda pouco estudada, necessita de investimento para estabelecimento de um programa de melhoramento genético eficiente. Sendo assim, grupos de pesquisa em Roraima tem realizado diversos estudos com o objetivo de caracterizar a variabilidade usando caracteres vegetativos, reprodutivos, químicos e genéticos. No entanto, ainda existe uma falta de estudos que combinem o uso de marcadores moleculares com outras variáveis permitindo avançar nos trabalhos de melhoramento e assim, desenvolver cultivares mais produtivas e com características de qualidade superior. Diante disso, objetivou-se com este trabalho combinar as variáveis moleculares e agronômicas do camu-camu presente na coleção de germoplasma da Embrapa-RR com a intenção de identificar indivíduos potenciais para os programas de melhoramento. Sendo assim, matrizes de dissimilaridade foram geradas para os dois conjuntos de dados, correlacionadas e combinadas para análise. A correlação indicou que a variação encontrada pelos dados agronômicos não está relacionada a variação encontrada pelos dados moleculares. A matriz obtida pela combinação das diferentes medidas de dissimilaridade foi representada pelo método de agrupamento UPGMA. Ao analisar o dendograma identificou-se que as subamostras AT13, BQ04, EV10, LR12, IAB04, AT08, BQ28, MU06 e LR05 são as mais divergentes sendo extremamente importante em programas de melhoramento selecionar indivíduos que apresentem bom desempenho em campo, mas que não sejam relacionados geneticamente possibilitando conservar uma maior variabilidade na coleção. Sugerimos que estas subamostras sejam avaliadas em campo para análise de desenvolvimento vegetativo e pós-colheita podendo incluir outros atributos.

Palavras-chave: domesticação, *Myrciaria dubia*, ISSR.

CHAPTER III - GENETIC AND MORPHOLOGICAL VARIABILITY OF THE CAMU-CAMU OF THE STATE OF RORAIMA

ABSTRACT

In Roraima, there are significant occurrences of native camu-camu populations, which are distributed in various parts of the state. This wealth, still little studied, requires investment to establish an efficient breeding program. Thus, research groups in Roraima have carried out several studies with the aim of characterizing the variability using vegetative, reproductive, chemical and genetic characters. However, there is still a lack of studies that combine the use of morphological and molecular markers, allowing us to progress in breeding work and, therefore, to find more productive cultivars with superior quality characteristics. The objective of this work was to relate the molecular and agronomic characteristics of the camu-camu present in the Embrapa-RR germplasm collection with the intention of identifying potential individuals for the development of its productive chain in the State. For this, dissimilarity matrices were generated for the two sets of data being combined through the sum of matrices. The matrix obtained by the sum of the different measures of dissimilarity was represented by the UPGMA grouping method. By joining the vegetative propagation data with the molecular data, we noticed that the sub-samples AT13, BQ04, EV10, LR12, IAB04, AT08, BQ28, MU06 e LR05 are the most divergent and it is extremely important in breeding programs to select individuals that perform well in the field, not genetically related.

Key words: domestication, *Myrciaria dubia*, ISSR.

INTRODUÇÃO

Os recursos fitogenéticos podem ser considerados como qualquer elemento vegetal com valor de uso atual ou potencial para o homem (NASS, 2001; GONÇALVES, 2016). Dentre os recursos genéticos vegetais voltados para a alimentação e agricultura, as espécies frutíferas se sobressaem pela grande diversidade e potencial que apresentam, sendo o Brasil o terceiro maior produtor mundial de frutas tropicais (PÁDUA & FERREIRA, 2012; SANTANA, 2016).

A região norte do país se destaca por possuir 44% da diversidade de frutas nativas do território nacional, no entanto, apenas 8% contribuem economicamente para o mercado brasileiro, ficando fora dessas estatísticas a maioria das espécies que ainda são pouco conhecidas quanto ao potencial de exploração econômico (CLEMENT et al., 2000; POLL et al., 2011).

O camu-camu [*Myrciaria dubia* (Kunth McVaugh)] ou caçari (denominação local) é uma espécie nativa da bacia Amazônica que cresce nas margens inundáveis dos corpos hídricos e ainda é pouco explorado (YUYAMA & VALENTE, 2011). Os frutos da espécie se destacam mundialmente pela valiosa fonte de polifenóis, antocianinas, ácido elágico, flavonóides, carotenóides e ácido ascórbico (GRIGIO et al., 2017).

No entanto, a domesticação do camu-camu já possui ações organizadas de pesquisa visando obter informações básicas de manejo e melhoramento, tanto no Brasil quanto no Peru (PANDURO et al., 2004). A demanda crescente do mercado está ocasionando níveis mais intensos de extração da espécie no meio natural, com risco de erosão genética e impactos negativos sobre outros organismos e no meio ambiente (PANDURO et al., 2001).

Em Roraima, é significativa a ocorrência de populações nativas de camu-camu, as quais estão distribuídas em diversas partes do Estado (CHAGAS et al., 2012). Essa riqueza, ainda pouco estudada, necessita de investimento para estabelecimento de um programa de melhoramento genético eficiente.

Sendo assim, no ano de 2016, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-RR) em parceria com a Secretaria Estadual de Planejamento (SEPLAN), incluíram no Plano Plurianual estudos com o camu-camu.

Desde então, diversos trabalhos foram realizados com o objetivo de caracterizar a variabilidade usando caracteres vegetativos, reprodutivos, químicos e genéticos (CHAGAS et al., 2015; LOZANO et al., 2016; SOUZA et al., 2019 – Dados ainda não publicados) com o intuito de identificar parâmetros que fossem capazes de indicar uma ampla variação entre os

indivíduos, permitindo assim, sistematizar as informações obtidas e apontar critérios para a seleção de plantas superiores.

No ano de 2017, foi lançado pelo governo o projeto 'Caçari de Roraima', que visa promover o desenvolvimento da cadeia produtiva do camu-camu incentivando o cultivo e a produção de mercadorias provenientes do fruto.

Os estudos de divergência genética através de marcadores morfológicos e moleculares são um dos mais importantes parâmetros avaliados pelos melhoristas de plantas na fase inicial, pois, se adequadamente explorada, pode acelerar o progresso genético para determinados caracteres (NEGREIROS et al., 2008).

Diante disso, o presente estudo teve por finalidade avaliar as características moleculares e agrônômicas da *M. dubia* presente na coleção de germoplasma da Embrapa-RR com o intuito de identificar indivíduos potenciais para os futuros programas de melhoramento genético.

MATERIAL E MÉTODOS

As subamostras de camu-camu (Figura 1) utilizadas nesta pesquisa são oriundas de populações nativas do estado de Roraima e foram selecionadas por Chagas et al. (2015) como promissoras pelos altos teores de ácido ascórbico, rendimento de polpa, massa de fruto e arquitetura de copa tipo taça.

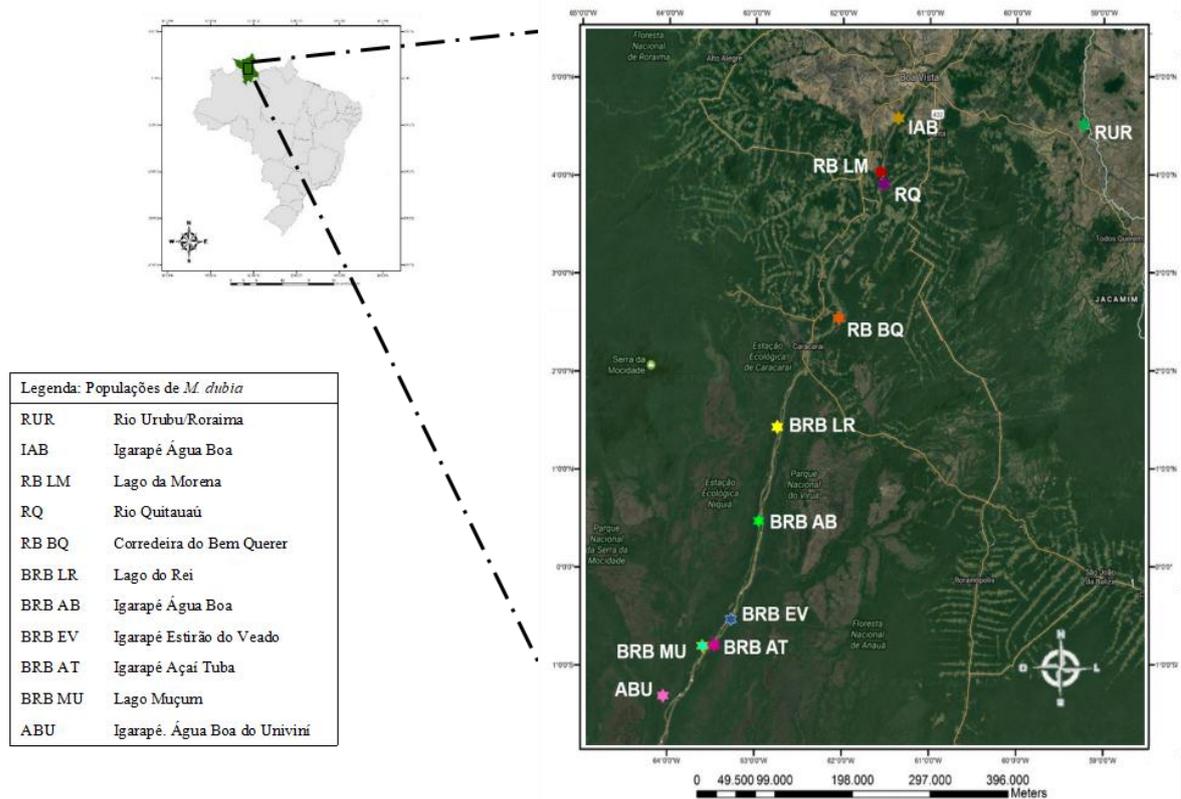
Com o intuito de continuar as pesquisas, Lozano (2016) coletou estacas lenhosas destas subamostras para realização de experimentos de propagação vegetativa podendo assim mensurar o número médio de brotos, comprimento do maior broto, número médio de raízes, comprimento da maior raiz, percentagem de brotação, percentagem de estacas enraizadas e percentagem de mudas formadas.

Em junho de 2016, a Coleção de Germoplasma foi criada implantando essas subamostras no Campo Experimental Serra da Prata sob condições de irrigação controlada.

O delineamento experimental da coleção foi montado em blocos ao acaso constituído por 53 tratamentos, três blocos com duas repetições (Apêndice 1).

Diante disso, Souza et al. (*in press*) coletou folhas jovens das mesmas subamostras iniciando estudos através de ferramentas moleculares para análise da variabilidade genética. O DNA foi extraído, quantificado e amplificado através de marcadores ISSR (UBC 811, UBC 814, UBC 117, UBC 868, UBC 880).

Figura 1 - Localização georreferenciada das 11 populações de camu-camu em diferentes regiões edafoclimáticas



Análise dos dados: Os dados obtidos por ambos os trabalhos (agronômicos + moleculares) foram então utilizados nesta pesquisa para se obter uma análise mais completa acerca da diversidade genética existente na coleção. Matrizes de dissimilaridade entre os 53 acessos de camu-camu, foram obtidas para cada uma das categorias de dados. A matriz de dissimilaridade dos dados agronômicos foi gerada a partir da distância generalizada de Mahalanobis (D^2_{ii}), utilizando o critério proposto por Singh (1981), calculando a contribuição relativa dos caracteres avaliados para a diversidade genética existente. A matriz de dissimilaridade dos dados moleculares foi obtida a partir do complemento do coeficiente de similaridade de Nei & Li (1979), através da análise de presença e ausência das bandas produzidas por cada iniciador. A distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações da espécie foi estimada através da Análise de Variância Molecular (AMOVA). As diferentes medidas de distância entre os acessos foram combinadas através da soma de matrizes. A associação entre as medidas de dissimilaridade obtidas das duas classes de variáveis (agronômicos e moleculares) foi analisada através da correlação entre matrizes, cuja significância foi testada através do teste de Mantel. As diferentes medidas de dissimilaridade foram comparadas quanto aos padrões de agrupamento dos acessos, produzidos pelo método de otimização de Tocher. A matriz obtida pela soma das diferentes medidas de

dissimilaridade, de cada conjunto de dados foi representada pelo método de agrupamento UPGMA. Todas as análises foram realizadas pelo Programa computacional em genética e estatística GENES versão 2017.3.25 (CRUZ, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, por meio das distâncias generalizadas de Mahalanobis (D^2_{ii}) foi possível verificar a contribuição relativa de cada variável para a diversidade genética das 53 subamostras analisadas através dos dados de propagação vegetativa (Tabela 1). A variável que mais contribuiu para diversidade genética foi a percentagem de estacas enraizadas (47,1%) seguido do número médio de raízes (26,38%).

A influência do componente genético na capacidade de enraizamento por estaquia tem sido descrito em vários estudos e com diversas espécies, tais como Guaranazeiro (ARRUDA et al., 2007; ALBERTINO et al., 2012), Oliveira (OLIVEIRA et al., 2012) e Nogueira-macadâmia (ENTELMANN et al., 2014). Para cada uma dessas espécies, os autores indicaram a existência de variabilidade genética para o caráter percentagem de enraizamento.

Tabela 1 – Contribuição relativa das variáveis agrônômicas para a divergência genética entre as 53 subamostras de *M. dubia*.

Variável	S.j	Valor (%)
Número médio de brotos	67895.738819	8.5537
Comprimento do maior broto	12660.271773	1.595
Número médio de raízes	209422.362415	26.3837
Comprimento da maior raiz	10352.582595	1.3043
Percentagem de brotação	91326.567476	11.5056
Percentagem de estacas enraizadas	373864.537669	47.1007
Percentagem de mudas formadas	28233.84205	3.557

Separadamente, os dados moleculares gerados através da amplificação de 64 fragmentos utilizando 5 iniciadores ISSR foram analisados através de uma AMOVA que indicou que a maior variabilidade genética encontra-se expressa entre os indivíduos dentro das populações (66,6%), e uma menor divergência entre as populações (33,4%) de camu-camu da coleção com $p = 0,01$.

Os padrões de distribuição da variabilidade genética estão altamente correlacionados com os sistemas reprodutivos das plantas (MARTINS, 1987) sendo esperado que espécies de fecundação cruzada e vida longa, acumulem maior variabilidade genética dentro das populações como é o caso do camu-camu.

Nunes et al. (2017) ao analisarem 10 populações de *M. dubia* provenientes do Lago dos Reis em Roraima, também encontraram maior variabilidade dentro (65%) do que entre as populações (35%).

O teste de Mantel constatou que as distâncias genéticas obtidas com base nos dados agronômicos não apresentaram correlação estatística com os dados moleculares (Tabela 2), indicando que a estimativa da dissimilaridade obtida com marcadores moleculares *ISSR* não pode ser extrapolada para a variação encontrada nos dados agronômicos das subamostras analisadas.

Tabela 2: Coeficiente de correlação e intervalo de confiança entre as matrizes de distância de dados de propagação vegetativa (matriz 1) e moleculares com base em marcadores *ISSR* (matriz 2), obtidos a partir da avaliação de 53 subamostras da Coleção de Germoplasma de camu-camu da Embrapa-RR.

Matrizes	Coeficientes de Correlação	Teste de Mantel – Níveis Críticos	
		5%	1%
1 x 2	-0.03508	-0.03598 / 0.01696	-0.05027 / 0.02208

Esse resultado pode ser visualizado pela tabela 3 através dos diferentes padrões de agrupamento apresentado pelo método de otimização de Tocher, para as matrizes de dissimilaridade de dados agronômicos e moleculares. A matriz 1 foi separada em 11 grupos distintos e a matriz 2 em 9 grupos, com pouquíssima semelhança entre os agrupamentos obtidos para cada matriz.

Tabela 3: Agrupamento pelo método de otimização de Tocher, das 53 subamostras de *M. dubia*, obtidos a partir da correlação de dados de propagação vegetativa (matriz 1) e moleculares com base em marcadores *ISSR* (matriz 2), e agrupamento a partir de soma das matrizes 1 + 2.

Grupo	Matriz (1)	Matriz (2)
1	LM47 LR04 LR11 IAB04 BQ27 BQ29	AB05 AT10 AB04 AB06 AT03 AB07 ABU02
	BQ26 LM26 AB06 LM27 IAB07 LM39	AT07 ABU01 AT08
2	BQ12 BQ28 BQ18 LM31 AT07 RUR04	BQ18 BQ29 BQ12 BQ27 EV07 EV06 LM29
	AT03 RUR05 AB08 LM30 EV09 MU11	LM31 LM30 LM27 IAB06 LM39 LM08 BQ03
3	EV07 EV10 IAB05 AB07 EV06 BQ03	IAB07 BQ26 IAB05 BQ32 BQ04 LR03 EV09
	LR05 LM29 AT08 ABU02 MU17	RUR02 LR11 LR04 RQ11 RUR01 RQ14
4		RUR03 MU17 MU06 MU11 LR05 RQ04
	AT13 RUR01 BQ04 RUR03	LM26 LM47
5	ABU01 BQ32 LR12	RUR04 RUR05
6	RQ04 RQ11 RQ14	EV10 LR12
7	IAB06 MU06	IAB04
8	AB04 LR03	AT13

8	AB05	AB08
9	RUR02	BQ28
10	AT10	
11	LM08	

Esse resultado é semelhante ao observado por Aguiar et al. (2011) para *Eugenia dysenterica* DC e entre acessos de *Anacardium* por Pessoni (2007) a partir de matrizes de distância genética de dados agronômicos e moleculares obtidos por marcadores ISSR.

Em geral, pode-se esperar uma correlação não muito pronunciada entre a diversidade molecular e a variação genética quantitativa dentro de populações (BADRI et al., 2008) devido ao fato de os marcadores serem seletivamente neutros, podendo perder variação genética mais rapidamente do que os *locos* envolvidos com a adaptação. Além disso, a expressão de caracteres fenotípicos é geralmente bastante plástica com respeito aos efeitos ambientais (MATHER, 1973), reduzindo a correlação entre esses parâmetros.

O agrupamento realizado pelo método UPGMA através da soma de matrizes permitiu separar as 53 subamostras em dois grupos (G1 e G2), com 5 subgrupos definidos pelo ponto de corte de 74% de dissimilaridade (Figura 1). No G2 estão representadas apenas duas subamostras com uma distância genética de aproximadamente 64%.

A análise de agrupamento tem por finalidade reunir, por um critério qualquer de classificação, as subamostras em vários grupos, de tal forma que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos (CRUZ & CARNEIRO, 2003).

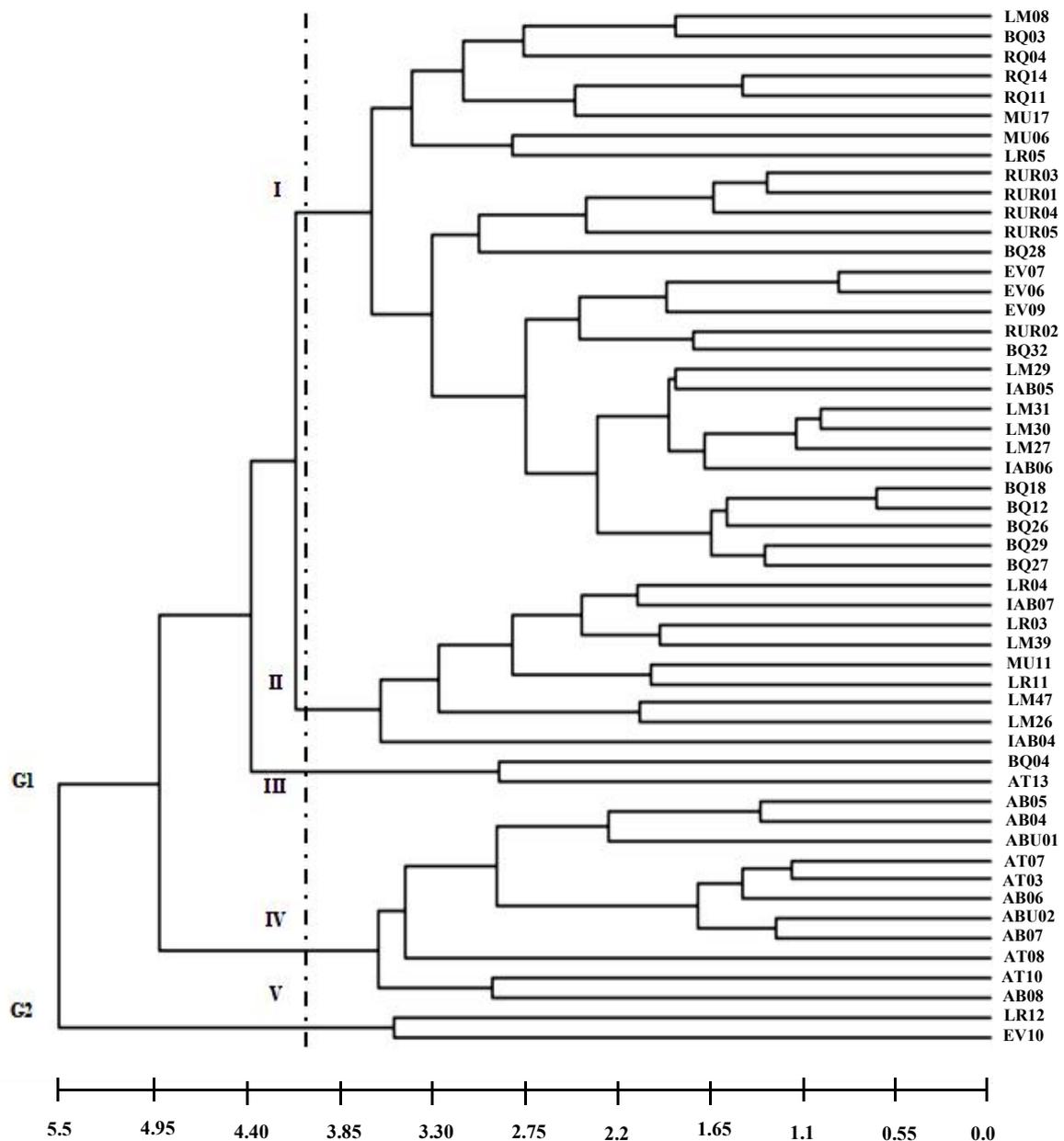
Apesar da ausência de correlação, as variáveis moleculares e agronômicas analisadas em conjunto trazem respostas complementares sendo possível destacar que as subamostras mais divergentes são AB08, AT10, AT08, AT13, BQ04, EV10, LR12, IAB04, BQ28, MU06 e LR05.

No trabalho desenvolvido por Lozano (2016) as subamostras LR05 (Localidade Lago dos Reis) e MU06 (Localidade Lago Muçum) se destacaram por apresentarem as maiores taxas na percentagem de brotação, percentagem de enraizamento e conseqüentemente na percentagem de plantas formadas, representando uma grande potencialidade na obtenção de subamostras promissoras para a formação de mudas.

As subamostras AT13 (Localidade Açaí Tuba), AB08 (Localidade Água Boa), BQ28 e IAB04 (Localidade Igarapé Água Boa) se agruparam isoladamente, formando grupos de um único indivíduo pelo método de otimização de Tocher sendo consideradas as mais divergentes.

Na prática agrônômica vale ressaltar a importância da obtenção de indivíduos com bom desenvolvimento no campo mas que acumulem variação genética significativa. Essa manutenção da variabilidade pode ser mantida através da preservação de indivíduos que possuem desenvolvimento mediano, mas que podem ajudar a manter a variabilidade da espécie através da manutenção dos seus alelos.

Figura 2 - Agrupamento das 53 subamostras de *M. dubia* pelo método UPGMA a partir da soma de matrizes de dados vegetativos (matriz 1) e moleculares com base em marcadores ISSR (matriz 2).



CONCLUSÃO

A técnica de marcadores ISSR associada com os dados agronômicos foi eficaz para se investigar a diversidade entre as subamostras de camu-camu, indicando que as populações estudadas possuem ampla variabilidade genética.

A variável que mais contribuiu para diversidade genética foi a percentagem de estacas enraizadas não havendo correlação entre a diversidade encontrada através de dados agronômicos com os dados moleculares. As subamostras que mais divergiram através do agrupamento UPGMA baseado na soma de matrizes foram AB08, AT08, AT10, AT13, BQ04, EV10, LR12, IAB04, BQ28, MU06 e LR05.

A partir desses dados, sugere-se que os mesmos sejam avaliados em campo para análises de desenvolvimento vegetativo e pós-colheita, podendo verificar outros atributos agronômicos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. V.; MOURA, N. F.; MOURA, M. F.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; CHAVES, L. J. Relação entre a variação genética de caracteres quantitativos e marcadores moleculares em subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 157 – 169, março, 2011.
- ALBERTINO, S. M. F.; NASCIMENTO FILHO, F. J. do; SILVA, J. F. da; ATROCH, A. L.; GALVÃO, A. K. L. Enraizamento de estacas de cultivares de guaranazeiro com adubação de plantas matrizes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 10, p. 1449-1454, 2012.
- ARRUDA, M. R. de; PEREIRA, J. C. R.; MOREIRA, A.; TEIXEIRA, W. Enraizamento de estacas herbáceas de guaranazeiro em diferentes substratos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 236-241, 2007.
- BADRI, M.; ZITOUN, A.; ILAHI, H.; HUGUET, T.; AQUANI, M.E. Morphological and microsatellite diversity associated with ecological factors in natural populations of *Medicago laciniata* Mill. (Fabaceae). **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 87, n. 3, [s.p.], 2008.
- BERTAN, I.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C.; VIEIRA, E. A.; IRINEU, H.; SILVA, J. A. G.; SHIMIDT, D. A. M.; VALÉRIO, I. P.; BUSATO, C. C.; RIBEIRO, G. **Comparação de métodos de agrupamento na representação da distância morfológica entre genótipos de trigo**. *Revista Brasileira de Agrocências*, v. 12, n. 3, p. 279-286, 2006.
- CHAGAS, E. A.; BACELAR-LIMA, C. G.; CARVALHO, A. dos S.; RIBEIRO, M. I. G.; SAKAZAKI, R. T.; NEVES, L. C. Propagação do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh). **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 6, n. 1, p. 67-73, 2012.
- CHAGAS, E. A.; LOZANO, R. M. B.; CHAGAS, P. C.; BACELAR-LIMA, C. G.; GARCIA, M. I.; OLIVEIRA, J. V.; SOUZA, O. M.; MORAIS, B. S.; ARAÚJO, M. C. R. Intraspecific

variability of camu-camu fruit in native populations of northern Amazonia. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 265-271, 2015.

CLEMENT, C. R.; NETO, J. T. F.; CARVALHO, J. E. U.; SOUZA, A. G. C.; GONDIM, T. M. S.; LEDO, F. J. S.; MULLER, A. A. **Fruteiras nativas da amazônia: o longo caminho entre caracterização e utilização**. Brasília: Tópicos atuais em botânica, 2000.

CRUZ, C. D. **Programa GENES: Análise multivariada e simulação**. Viçosa: UFV, 175p. 2006.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, p. 357-434, 2003.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.

ENTELMANN, F. A.; SCARPARE FILHO, J. A.; PIO, R.; SILVA, S. R. da; SOUZA, F. B. M. de. Emergência de plântulas e enraizamento de estacas e alporques de porta-enxertos de noqueira-macadâmia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 237-242, 2014.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; OLIVEIRA, E.J.; PEIXOTO, J.R.; COSTA, A.M. **Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro: histórico e perspectivas**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. 36 p. (Documentos/Embrapa Cerrados Nº 307).

GONÇALVES, A. R. **Variabilidade genética molecular em uma coleção de germoplasma de *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae)**. Dissertação (Mestrado em genética e melhoramento de plantas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

GRIGIO, M. L.; CHAGAS, E. A.; RATHINASABAPATHI, B.; CHAGAS, P. C.; DA SILVA, A. R. V.; SOBRAL, S. T. M.; DE OLIVEIRA, R. R. Qualitative evaluation and biocompounds present in different parts of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit. **African Journal of Food Science**, v. 11, n. 5, p.124-129. 2017.

LOZANO, R. M. B. **Diversidade de populações nativas de camu-camu (*Myrciaria dubia* (kunth) Mc Vaugh) do estado de Roraima baseada em características morfoagronômicas**. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2016.

LOZANO, R. M. B.; CHAGAS, E. A.; SMIRDELE, O.; RODRIGUEZ, C. A.; CHAGAS, P. C.; MOTA FILHO, A. B.; SOUZA, O. M.; CORDEIRO, A. C. C. Genetic Divergence among Camu-Camu Plant Populations Based on the Initial Characteristics of the Plants. **Journal of Agricultural Science**, v. 8, n. 11, p. 51-58, 2016.

MARTINS, P. S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação “in situ”. **Scientia Forestalis**, v. 35, n. 2, p. 71-78, 1987.

MATHER, K. **Genetical structure of populations**. London: Chapman and Hall, 1973.

NASS, L. L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, cap 2, p. 29-55. 2001.

NEGREIROS, J. R. S.; ALEXANDRE, R. S.; ÁLVARES, V. S.; BRUCKNER, C. H.; CRUZ, C. D. Divergência genética entre progênies de maracujazeiro-amarelo com base em características das plântulas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, 197-201, 2008.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 76, n. 10, p. 5269-5273, jan. 1979.

NUNES, C. F.; SETOTAW, T. A.; PASQUAL, M.; CHAGAS, E. A.; SANTOS, E. G.; SANTOS, D. N.; LIMA, C. G. B.; CANÇADO, G. M. A. *Myrciaria dubia*, an Amazonian fruit: population structure and its implications for germplasm conservation and genetic improvement. **Genetics and Molecular Research**, v.16, n.1, p. 1-12. 2017.

OLIVEIRA, M. C.; RAMOS, J. D.; PIO, R.; SANTOS, V. A. dos; SILVA, F. O. R. Enraizamento de estacas em cultivares de oliveiras promissoras para a Serra da Mantiqueira. **Revista Ceres**, v. 59, n.1, p. 147-150, 2012.

PÁDUA, J. G.; FERREIRA, F. R. Recursos genéticos de Espécies Frutíferas. In: COSTA, A. M.; SPEHAR, C. R.; SERENO, J. R. B. **Conservação de recursos genéticos no Brasil**. Brasília: Embrapa, p. 350-379. 2012.

PANDURO, M.; LINARES, C.; MENDOZA, H.; ANGUIZ, R. **Plan de mejoramiento genético de camu camu**. Iquitos: Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana, 52p. 2004.

PANDURO, M. P.; RIVA, R.R.; RENGIFO, S.E.; DELGADO, V.C.; VILLACRÉS, V.J.; GONZÁLEZ, C.A.; INGA, S.H.; LÓPEZ, U.A.; FARROÑAY, P.R.; VEGA, V.R.; LINARES, B.C. **Sistema de producción de camu-camu en restinga**. Iquitos: Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana, 141p. 2001.

PANTOJA, T. F. **Descrição morfológica e análise da variabilidade genética para caracteres de frutos, sementes e processo germinativo associado a produtividade de óleo em matrizes de *Carapa guianensis* Aublet, uma meliaceae da Amazônia**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de plantas) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

PESSONI, L. A. **Estratégias de análise da diversidade em germoplasma de cajueiro (*Anacardium spp.* L.)**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

POLL, H; ZAMBERLAN, A. V.; KIST, B. B.; SANTOS, C.; CARVALHO, C.; REETZ, E. R.; BELING, R.R. **Anuário Brasileiro da Fruticultura 2011**. Santa Cruz do Sul: Gazebo, 128 p. 2011.

SANTANA, J. G. S. **Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em população natural de cambuizeiro (*Myrciariatenella o. Berg*)**. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2016.

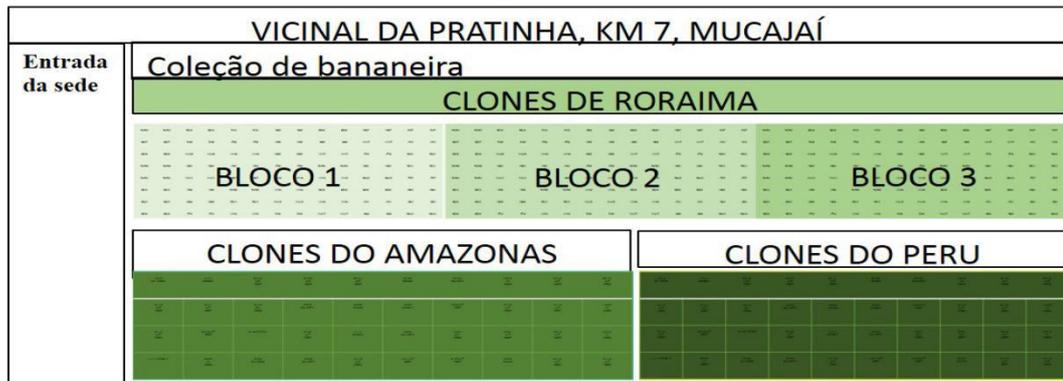
SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, v. 41, n. 1, p. 237-245, 1981.

YUYAMA, K.; VALENTE, J. P (orgs.). **Camu-camu *Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh.**
1.ed. Curitiba, PR: CRV, 216p. 2011.

APÊNDICE

APÊNDICE 1 – Croqui dos acessos de *M. dubia* implantados no campo experimental Serra da Prata, Vicinal da Pratinha Km 7, Mucajáí.

CLONES DE RORAIMA													
Bloco 1													
RUR0 4	RUR0 4	BQ18	BQ18	EV10	EV10	AB06	AB06	BQ03	BQ03	IAB07	IAB07	EV07	EV07
BQ27	BQ27	EV06	EV06	AT03	AT03	LR05	LR05	AB05	AB05	LM47	LM47	LR12	LR12
BQ28	BQ28	MU06	MU06	LM08	LM08	IAB05	IAB05	LM27	LM27	AT13	AT13	RQ04	RQ04
RUR0 3	RUR0 3	IAB04	IAB04	LR04	LR04	AT08	AT08	RUR0 2	RUR0 2	IAB01	IAB01	RQ11	RQ11
RUR0 1	RUR0 1	MU11	MU11	AB07	AB07	LM26	LM26	LM29	LM29	ABU0 2	ABU0 2	AT07	AT07
BQ12	BQ12	LR03	LR03	RUR0 5	RUR0 5	LM30	LM30	BQ26	BQ26	BQ32	BQ32	IAB02	IAB02
BQ04	BQ04	IAB06	IAB06	RQ14	RQ14	MU16	MU16	LM39	LM39	LR11	LR11	AB04	AB04
BQ29	BQ29	AT10	AT10	LM31	LM31	EV09	EV09	MU17	MU17	AB08	AB08	ABU0 1	ABU0 1
Bloco 2													
MU06	MU06	AT08	AT08	LR05	LR05	AB08	AB08	RUR0 5	RUR0 5	IAB04	IAB04	RUR0 5	RUR0 5
LR03	LR03	BQ32	BQ32	BQ18	BQ18	BQ12	BQ12	EV09	EV09	BQ03	BQ03	RQ04	RQ04
IAB06	IAB06	MU17	MU17	RUR0 4	RUR0 4	AT13	AT13	EV10	EV10	EV07	EV07	ABU0 1	ABU0 1
AB06	AB06	BQ28	BQ28	LM29	LM29	AT03	AT03	AB07	AB07	LR12	LR12	RQ11	RQ11
LM26	LM26	EV06	EV06	BQ29	BQ29	LM30	LM30	AT10	AT10	LM31	LM31	AT07	AT07
ABU0 2	ABU0 2	BQ04	BQ04	LR04	LR04	LM08	LM08	RUR0 3	RUR0 3	IAB01	IAB01	RQ14	RQ14
MU16	MU16	LM27	LM27	BQ26	BQ26	MU11	MU11	LM39	LM39	IAB07	IAB07	AB04	AB04
RUR0 1	RUR0 1	BQ27	BQ27	LR11	LR11	RUR0 2	RUR0 2	AB05	AB05	LM47	LM47	IAB05	IAB05
Bloco 3													
RUR0 3	RUR0 3	LM30	LM30	BQ27	BQ27	AT03	AT03	AB04	AB04	EV07	EV07	AT07	AT07
AT08	AT08	BQ32	BQ32	IAB06	IAB06	AB05	AB05	MU11	MU11	EV09	EV09	RQ04	RQ04
RUR0 1	RUR0 1	LR11	LR11	ABU0 2	ABU0 2	MU16	MU16	IAB07	IAB07	LM31	LM31	AB08	AB08
BQ28	BQ28	MU06	MU06	BQ18	BQ18	LR03	LR03	RQ11	RQ11	LM08	LM08	RQ14	RQ14
RUR0 4	RUR0 4	BQ03	BQ03	LM29	LM29	LR04	LR04	LM39	LM39	LM47	LM47	ABU0 1	ABU0 1
LM27	LM27	LR05	LR05	BQ29	BQ29	LM26	LM26	LR12	LR12	BQ12	BQ12	AT13	AT13
EV06	EV06	AB06	AB06	AB07	AB07	AT10	AT10	IAB05	IAB05	RUR0 2	RUR0 2	IAB01	IAB01
MU17	MU17	BQ04	BQ04	BQ26	BQ26	RUR0 5	RUR0 5	IAB04	IAB04	EV10	EV10	LM39	LM39



LEGENDAS: CLONES DE RORAIMA	
RUR	Rio Urubú
AT	Rio Branco/Lago Açai tuba
BQ	Rio Branco/Cachoeira Bem Querer
LM	Rio Branco/Lago da Morena
EV	Rio Branco/Lago Estirão do Veado
MU01	Rio Branco/Lago Muçum
LR	Rio Branco/Lago do Rei
AB	Rio Branco/Lago Água Boa
ABU	Rio Água Boa do Univini
IAB	Rio Mucajáí/Igarapé Água Boa
RQ	Rio Quitauá
aaaa	Indivíduos replantados e vivos
aaaa	Indivíduos replantados mas que não sobreviveram

CROQUI SERRA DA PRATA
Autores: Clediane Gomes de Souza, Raissa Maria Sampaio Rodrigues, Roberto Tadashe Sakasaki, Edvan Alves Chagas, Fabiana Granja.
Projeto: Estudo da biodiversidade e de técnicas convencionais visando a domesticação, melhoramento e valoração de fruteiras nativas da Amazônia.