**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Desenvolvimento de marcadores microssatélites e análise da diversidade e estrutura genética de populações de cambuci (*Campomanesia phaea*)

Rafael Oliveira Moreira

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2017**

Rafael Oliveira Moreira
Bacharel em Ciências Biológicas

Desenvolvimento de marcadores microssatélites e análise da diversidade e estrutura genética de populações de cambuci (*Campomanesia phaea*)
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **FRANCISCO DE ASSIS ALVES MOURÃO FILHO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Moreira, Rafael Oliveira

Desenvolvimento de marcadores microssatélites e análise da diversidade e estrutura genética de cambuci (*Campomanesia phaea*) / Rafael Oliveira Moreira. - - versão revisada de acordo com a redolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

88 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Mata Atlântica 2. Frutífera nativa 3. SSR 4. Variabilidade genética 5. Coleção central I. Título

**Aos meus pais Messias e Eneida, a meu irmão Lucas pelo amor, carinho, paciência,
incentivo durante a realização deste trabalho.**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre estar do meu lado, me guiando, protegendo e iluminado meu caminho.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pelo apoio científico, estrutural, financeiro e corpo técnico que foram indispensáveis para realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho pela orientação, paciência e conhecimentos adquiridos durante o curso de mestrado.

Ao Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira pela colaboração na execução deste trabalho, por todo conhecimento transmitido e pela disponibilização do laboratório para execução das atividades.

Ao Dr. Eduardo Bressan de Andrade por todo apoio, conhecimento, execução, experiências trocadas, sugestões e contribuições ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A toda equipe técnica do Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP pelo suporte e auxílio durante a realização deste trabalho. Em especial, agradeço ao Felipe Buck Campana pela amizade, auxílio e toda atenção e apoio científico durante minha permanência no laboratório.

A todos os alunos do Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP por me receberem de braços abertos e por toda ajuda nesse tempo que passamos juntos.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas pela amizade durante o curso de mestrado. Em especial, agradeço à técnica Liliane Stipp pelos momentos de aprendizagem, auxílio técnico e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Horst Bremer Neto pelo apoio durante as coletas do material vegetal, pelas experiências trocadas e pelo conhecimento adquirido durante as viagens.

Ao Prof. Dr. Angelo Pedro Jacomino coordenador do projeto de pesquisa envolvendo fruteiras nativas pela parceria durante a realização das coletas, pelas sugestões e apoio durante a o desenvolvimento da pesquisa.

À Maria Solizete Silva, secretária do Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, por toda ajuda, atenção, prontidão, amizade, apoio durante minha permanência na ESALQ.

Às minhas grandes amigas Yane Caroline dos Anjos e Girlane Oliveira por todo carinho, atenção, conhecimento, ajuda, apoio por todo esse tempo que passamos juntos durante a realização do mestrado.

Aos meus queridos pais, Messias e Eneida, por todo amor, carinho, compreensão, paciência, educação, por sempre me apoiarem, pelos valores ensinados, pela confiança, e por me compreender pelos momentos difíceis que passamos afastados durante a realização deste trabalho.

Ao meu irmão, pelo amor, preocupação e auxílio durante o curso de mestrado.

Ao Michael de Oliveira Santos pela paciência, amor, carinho, suporte, conselhos, lealdade, confiança, apoio e incentivo.

Aos meu grandes e queridos amigos Alexander Ladeira, Ewerthon Oliveira, Ewerton Nascimento, Samuel Chaves e Thiago Melero por todo carinho, suporte, atenção, pelos momentos de descontração e por torcerem pelo meu sucesso.

Aos meus familiares, tios e primos pelo amor, confiança, apoio, orações, conselhos, ensinamentos durante minhas jornadas.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO.

“Porque quem se eleva, será humilhado e quem se humilha, será elevado”

(Lucas 14, 11)

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Bioma Mata Atlântica	15
2.2 A família <i>Myrtaceae</i>	19
2.3 Cambuci	21
2.4 Diversidade genética	25
2.5 Marcadores moleculares.....	28
2.5.1 Marcadores <i>restriction fragment length polymorphism</i> (RFLP)	29
2.5.2 Marcadores <i>random amplified polymorphic DNA</i> (RAPD)	30
2.5.3 Marcadores <i>inter-simple sequence repeat</i> (ISSR)	31
2.5.5 Marcadores <i>Internal Transcribed Spacer</i> (ITS)	32
2.5.6 Marcadores Microssatélites	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Material vegetal.....	37
3.2 Extração do DNA genômico, quantificação e qualificação.....	38
3.3 Construção da biblioteca genômica enriquecida	39
3.4 Clonagem dos fragmentos selecionados.....	41
3.5 Isolamento do DNA Plasmidial por lise alcalina	41
3.6 Sequenciamento dos clones positivos	42
3.7 Desenvolvimento dos iniciadores.....	43
3.8 Validação, amplificação e análise de microssatélites	43
3.9 Análise da diversidade genética	45
3.10 Construção da coleção nuclear (<i>Core collection</i>).....	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Extração, quantificação e qualificação do DNA genômico.....	47
4.2 Desenvolvimento dos iniciadores de microssatélites	48
4.3 Validação, amplificação e análise de microssatélites.....	52
4.4 Análise da diversidade genética	55
4.5 Estrutura genética das populações de cambuci	58
4.6 Coleção nuclear (<i>Core collection</i>).....	63
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
REFERÊNCIAS	69

RESUMO

Desenvolvimento de marcadores microssatélites e análise da diversidade e estrutura genética de populações de cambuci (*Campomanesia phaea*)

O bioma Mata Atlântica contém muitas espécies frutíferas, sendo que o cambuci (*Campomanesia phaea*) se destaca por ser rico em vitamina C, com propriedades antioxidantes e adstringentes, que combatem radicais livres, além levar ao fortalecimento do sistema imunológico. Apesar do grande potencial de exploração, o cambuci é uma espécie semi-domesticada, e, atualmente, não há informações sobre sua diversidade genética. O conhecimento da variabilidade genética do cambuci é importante para o estabelecimento de estratégias de conservação, além de orientar pesquisas relacionadas a programas de coleta de material genético para bancos de germoplasma, já que a espécie se encontra em áreas prioritárias para conservação no Brasil. Existem diversos tipos de marcadores moleculares, sendo que os marcadores microssatélites têm sido considerados ideais para a caracterização e avaliação da diversidade genética em diversas culturas, por serem altamente polimórficos, de fácil interpretação e serem amplificados via PCR. Assim, buscou-se neste trabalho desenvolver marcadores microssatélites e avaliar a diversidade genética de 145 acessos de cambuci distribuídos em cinco populações, coletadas na vertente da Serra do Mar no Estado de São Paulo - Brasil (Juquitiba, Paraibuna, Mogi das Cruzes, Ribeirão Pires e Salesópolis). A biblioteca genômica enriquecida em microssatélites para cambuci gerou 16 *loci* microssatélites. Seis *loci* apresentaram perfis polimórficos, revelando dois a seis alelos em um total de 26 alelos. A partir das frequências alélicas, foram avaliados os parâmetros de diversidade, tais como número médio de alelos por loco ($\bar{A} = 3,83$), porcentagem média de loci polimórficos ($P = 0,57$), heterozigosidade esperada ($H_E = 0,57$) e heterozigosidade observada ($H_O = 0,54$). A análise da estrutura genética permitiu verificar que a maior parte da diversidade genética se encontra dentro das populações ($H_S = 0,57$) enquanto que a diversidade entre as populações foi baixa ($G_{ST} = 0,19$). A análise de agrupamento, baseada na distância genética de Nei, indicou que as cinco populações estão próximas entre si geneticamente, e os dados sustentam a hipótese que a distância genética entre elas pode ser atribuída pela distância geográfica, com exceção da população de Salesópolis à qual não foi possível fazer essa analogia. A partir dos dados obtidos pelos marcadores microssatélites, foi possível separar 18 genótipos distribuídos entre as cinco populações que representa toda diversidade genética das populações para formar uma coleção nuclear.

Palavras-chave: Mata Atlântica; Frutífera nativa; SSR; Variabilidade genética; Coleção central

ABSTRACT

Development of microsatellite markers and analysis of the diversity and genetic structure of cambuci (*Campomanesia phaea*)

The Atlantic Forest biome has many fruit species, and cambuci (*Campomanesia phaea*) stands out due to its high content of vitamin C and its antioxidant and astringent properties, which combat free radicals, besides strengthening the immune system. Despite the great market potential, cambuci is a semi-domesticated species for which there is currently no information about its genetic diversity. The knowledge of the cambuci genetic variability is important for the establishment of conservation strategies, besides giving direction to research actions related to genetic material collection programs for the construction germplasm banks, considering that this species is located in conservation priority areas of Brazil. There are several types of molecular markers, and microsatellite markers have been considered ideal for the characterization and evaluation of genetic diversity in several crops because they are highly polymorphic, easily interpreted, and amplified via PCR. Thus, this work aimed to develop microsatellite markers and to evaluate the genetic diversity in 145 cambuci accesses distributed in five different populations collected at the Serra do Mar slope in the State of São Paulo - Brazil (Juquitiba, Paraibuna, Mogi das Cruzes, Ribeirão Pires and Salesópolis). The genomic library enriched in microsatellites for cambuci generated 16 microsatellite *loci*. Six *loci* had polymorphic profiles, revealing two to six alleles in a total of 26 alleles. From the allele frequencies, different diversity parameters were evaluated, such as the average number of alleles per locus ($A = 3.83$), mean percentage of polymorphic *loci* ($P = 0.57$), expected heterozygosity ($H_e = 0.57$), and observed heterozygosity ($H_o = 0.54$). The genetic structure analysis allowed to verified that most of the genetic diversity is found within the populations ($H_s = 0.57$), while the diversity among the populations was low ($G_{ST} = 0.19$). The cluster analysis, based on the genetic distance of Nei, indicated that the five populations are genetically close to each other, and the data support the hypothesis that the genetic distance among them can be attributed to geographic distance, except for the population of Salesópolis that was not possible to make this analogy. From the data obtained by the microsatellite markers, it was possible to separate 18 genotypes distributed among the five populations that represent all the genetic diversity of the populations to form a core collection.

Keywords: Atlantic forest; Native fruit; SSR; Genetic variability; Core collection

1. INTRODUÇÃO

Considerada uma das maiores florestas tropicais do mundo, a Mata Atlântica está presente desde o norte do Piauí até o sul do Rio Grande do Sul. Sua distribuição ocorre por toda costa brasileira, se estendendo por centenas de quilômetros continente adentro. Trata-se de uma floresta tropical úmida, sendo um dos biomas mais ricos em diversidade biológica do mundo (MYERS et al., 2000; APRÍGIO-ASSIS, 2011).

A Mata Atlântica sustenta uma das taxas mais elevadas de riqueza de espécies e endemismos, ou seja, espécies que ocorrem somente na Mata Atlântica (RIBEIRO et al., 2009). O bioma exibe uma abundância de formações, que integra um diversificado agrupamento de ecossistemas florestais com estrutura e composições florísticas diferenciadas de acordo com o clima da região onde ocorre, resultando em uma diversidade elevada, tanto na fauna como na flora (SILVA; CASTELETTI, 2003; RIBEIRO et al., 2009).

A Mata Atlântica possui muitas espécies frutíferas, algumas mais conhecidas, tais como a goiaba (*Psidium guajava*) e jabuticaba (*Plinia trunciflora*), e outras pouco conhecidas, como o cambuci (*Campomanesia phaea*), grumixama (*Eugenia brasiliensis*), uvaia (*Eugenia pyriformis*) e cereja do rio grande (*Eugenia involucrata*) (SILVA et al., 2014). Os gêneros *Eugenia*, *Compomanesia*, *Psidium* e *Myrciaria*, pertencentes a família *Myrtaceae*, representam apenas uma pequena parte do grupo de espécies frutíferas com grande interesse e potencial econômico a ser explorado (LANDRUM; KAWASAKI, 1997).

Dentre as frutíferas da Mata Atlântica, o cambuci [*Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum] tem se destacado por ser uma excelente fonte de vitamina C, com propriedades antioxidantes e adstringentes, que combatem radicais livres e o colesterol, além de fortalecerem o sistema imunológico (ANDRADE et al., 2011). A espécie estava ameaçada de extinção devido à exploração predatória da sua madeira para fabricação de ferramentas e também pelo desmatamento da Mata Atlântica (KAWASAKI; LANDRUM, 1997), mas graças ao seu potencial socioeconômico sustentável, o processo de extinção vem gradativamente sendo revertido (ANDRADE et al., 2011). O cambuci é uma espécie endêmica do Brasil e possui distribuição nos estados de São Paulo e Minas Gerais, na vertente da Serra do Mar, área denominada Floresta Costal Atlântica (LORENZI et al., 2006).

Os frutos do cambuci possuem forte aroma doce, mas têm sabor azedo, como limões. Apresentam formato rombóide e coloração verde, são carnosos, suculentos, comestíveis e apreciados pela população rural da região da Serra do Mar (ANDRADE et al., 2011). Os frutos maduros são extremamente aromáticos e muito utilizados no preparo de sucos, sorvetes

e bebidas alcoólicas pela população das cidades produtoras da fruta, e ainda possuem grande potencial como agentes flavorizantes em alimentos e bebidas (VALLILO et al., 2005). Os frutos também contêm quantidades significativas de vitamina C e sólidos solúveis, e são importantes fonte de compostos fenólicos e fibras alimentares. As folhas e a cascas do vegetal possuem características adstringentes e aromáticas onde são utilizadas na elaboração de xaropes (ADATI, 2001; MATHIAS; ANDRADE et al., 2013; SANCHES, 2013).

O cambuci possui grande potencial de mercado, devido às suas características nutricionais, fitoterápicas e sabor exótico (KAWASAKI; LANDRUM, 1997; ANDRADE et al. 2011). Atualmente, o cultivo de cambuci é feito em pequenos cultivos por ser uma planta ainda não domesticada, sendo de grande interesse a domesticação da espécie para formação de pomares que visam atender o mercado consumidor, que está em crescimento desde a criação da Rota Gastronômica do cambuci (CORDEIRO, 2015).

A pesquisa em recursos genéticos e melhoramento vegetal é muito importante, e é considerada uma das atividades mais relevantes do sistema de inovação agropecuária do Brasil, tendo produzido resultados que contribuíram significativamente para os principais ganhos qualitativos e quantitativos alcançados pela agricultura brasileira nas últimas décadas (QUEIROZ; LOPES, 2007). A caracterização da diversidade genética possibilita conhecer o germoplasma disponível, além de ser essencial para o desenvolvimento de materiais elites e para o desenvolvimento de estratégias de conservação da espécie (BRESSAN et al., 2012).

Por muitos anos a diversidade genética tem sido avaliada por análises do fenótipo do organismo. No reino vegetal, a mensuração da diversidade é feita por meio de características agromorfológicas (FERREIRA et al., 2007). A diversidade genética pode também ser avaliada por métodos moleculares, ou seja, pela detecção de polimorfismos nas sequências de DNA (BRESSAN, 2011). A detecção de polimorfismo entre indivíduos é revelada por marcadores moleculares, que permitem a detecção de mutação de ponto seja por inserção ou por deleção na região do genoma analisada (FERREIRA et al., 2007).

Os marcadores moleculares são definidos como qualquer fenótipo molecular derivado de um polimorfismo de sequência de DNA, referente a um sítio conhecido ou anônimo do genoma (FERREIRA; GRATTAPLAGLIA, 1998). Existem diferentes tipos de marcadores moleculares, sendo que os marcadores microssatélites têm se constituído no melhor marcador para estudos de diversidade genética, pelo fato de serem altamente polimórficos, apresentarem fácil interpretação e serem amplificados via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (SOUZA, 2002). Além disso, os microssatélites são considerados ideais para caracterização e avaliação da diversidade genética em numerosas culturas (GRAPIN, 1998), como também

constituem uma ferramenta útil na análise populacional, construção de mapas genéticos, fluxo gênico, estudos ecológicos e biologia da conservação (ZUCCHI et al., 2003; CHASE et al., 1996; RAFALSKI et al., 1996).

Para a espécie cambuci, ainda não há iniciadores de microssatélites específicos desenvolvidos. A caracterização de marcadores microssatélites para essa fruteira não apenas será útil para avaliar a diversidade genética que existe entre os indivíduos, como também será um recurso que poderá ser utilizado futuramente em programas de melhoramento, enfatizando a importância de conservar a diversidade local, como uma forma de contribuição para o aumento e manutenção da variabilidade.

O presente trabalho reúne alguns dos objetivos de projeto temático que aborda os estudos de frutíferas nativas do bioma Mata Atlântica potencialmente funcionais (cambuci, uvaia, cereja do rio grande e grumixama) quanto à caracterização, multiplicação e conservação pós colheita com intuito de viabilizar suas explorações comerciais.

Este estudo teve por objetivo o desenvolvimento e a caracterização de *loci* microssatélites específicos para cambuci para a caracterização da diversidade e estrutura genética de cinco populações de cambuci da região da Serra do Mar do Estado de São Paulo. Entre os objetivos específicos, destacam-se a construção de biblioteca genômica enriquecida com sequências de microssatélites, análise da diversidade e estruturação genética dos acessos dentro e entre as populações e a construção de uma coleção nuclear.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bioma Mata Atlântica

O bioma Mata Atlântica compreende uma das maiores formações florestais que recobrem as serras que acompanham a costa brasileira, se estende desde o Rio Grande do Norte até o nordeste do Rio Grande do Sul, e está presente continente adentro (MYERS et al., 2000). O bioma representa 0,8% da superfície terrestre do planeta, onde estão presentes mais de 5% das espécies de vertebrados do mundo e sua flora compreende cerca de 5% da flora mundial (SOS MATA ATLÂNTICA, 2015). O bioma Mata Atlântica é um dos mais ricos em diversidade biológica, mas também um dos mais ameaçados do planeta (MYERS et al., 2000).

O bioma Mata Atlântica é umas das formações mais antigas do Brasil, e apesar de apresentar variações em toda sua extensão, há uma certa homogeneidade em suas características devido às suas semelhanças nas condições climáticas e geológicas (BROWN; BROWN, 1992). A alta diversidade de espécies é resultado de uma série de ecossistemas cujos processos ecológicos se interligam, facilitando o trânsito de animais e colaborando para o fluxo gênico das espécies (LEÃO, 2012).

A evolução do bioma Mata Atlântica é demarcada por ciclos de intercâmbio biológico, ou seja, através de conexões com outras formações florestais do continente sul americano, tais como a Amazônia e florestas andinas, seguidos por estágios de isolamento, que resultaram em especiação geográfica (SOUZA, 2009). Sendo assim, sua fauna e flora é formada tanto por espécies antigas (pré-Pleistoceno), quanto por espécies novas (Pleistoceno) (SILVA et al., 2004).

As principais características do bioma Mata Atlântica incluem vegetação muito úmida, temperatura em torno de 25°C, pluviosidade anual entre 2400 e 4000 mm, permanência de inúmeros rios e riachos e a manutenção de grande variedade de espécies vegetais e animais (GOERCK, 1999). É uma das florestas que possui elevados níveis de endemismo, que inclui mais de 20.000 espécies de plantas, mais de 2.000 espécies de animais vertebrados e aproximadamente 480 espécies de animais invertebrados (GOERCK, 1997; MITTERMEIER et al., 1999; SILVA; CASTELETTI, 2003).

A ampla variação longitudinal do bioma Mata Atlântica, que compreende desde o Rio Grande do Sul até o Piauí, resulta em diferentes composições florestais de acordo com a quantidade de chuva e microclima de cada região, sendo que regiões costeiras recebem maior volume de chuva do que regiões interiores (CÂMARA, 2003). Quanto mais interioranas, o

bioma Mata Atlântica se torna cada vez mais sazonal, com índice de pluviosidade anual caindo de 4000 mm para 1000 mm em algumas áreas da Serra do Mar (TABARELLI et al., 2005). A floresta também possui uma ampla variação altitudinal, além de apresentar tipos vegetacionais tais como: formações abertas, mistas e densas, semi-decíduas e decíduas (FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 1993).

O bioma Mata Atlântica é integrado por três formações diferentes: as matas de planícies litorâneas e as matas de encosta e as matas de altitude (JOLY et al., 1991). Nas regiões Sul e Sudeste, com ressalva do estado do Espírito Santo, prevalece a floresta de encosta, já na região Nordeste, predomina a floresta de terras baixas (TABARELLI; MANTOVANI, 1999). Do ponto de vista fitogeográfico, o bioma é composto por dois conjuntos distintos, um formado pela região Nordeste e outro, pela região Sudeste/Sul, sendo que o estado do Espírito Santo comporta uma flora intermediária entre os dois (SIQUEIRA, 1994).

O bioma representa uma das regiões mais ricas em biodiversidade do planeta, sendo decretada Reserva da Biosfera pela Unesco, Patrimônio Nacional pela Constituição Federal de 1988 e considerada um *hotspot* mundial para a conservação, devido à ameaça à qual toda sua riqueza faunística e de flora estão sujeitas. (MITTERMEIER et al., 2005). O conceito de *hotspot* foi aperfeiçoando ao longo do tempo desde sua primeira formulação feita por Norman Myers (1988). Para um bioma ser classificado como *hotspot*, a área deve cumprir dois requisitos principais: comportar pelo menos 1.500 espécies de plantas vasculares endêmicas e devem apresentar 30% ou menos da sua vegetação primária preservada.

Figura 1. Cobertura atual da Mata Atlântica e seus remanescentes (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2015)

O bioma Mata Atlântica é altamente ameaçado pela expansão da indústria, da agricultura, e pela possível perda de espécies conhecidas ou ainda não identificadas (RAUB et al., 2014). As florestas remanescentes do bioma se reduziram a diversos arquipélagos de segmentos florestais, muito reduzidos e altamente isolados entre si (Figura 1) (GASCON et al., 2000).

Geralmente, os fragmentos de populações remanescentes de Mata Atlântica encontram-se vulneráveis pelo isolamento e tamanho populacional reduzido. A preocupação com a conservação desses fragmentos intensifica o interesse em analisar as consequências genéticas da fragmentação do habitat nessas comunidades (BAJAY, 2014). A fragmentação da floresta resulta em uma drástica redução da diversidade biológica, além de levar também a mudanças no microclima, afetando diretamente as relações ecológicas do bioma (RAUSER; ACKERLY, 1987). O desmatamento do bioma Mata Atlântica pode resultar na extinção de milhares de espécies, sendo que muitas podem ter sido extintas antes mesmo de serem descritas (REIS et al., 1992). As principais causas da perda da biodiversidade estão diretamente relacionadas à superexploração dos recursos florestais por populações humanas (madeira, frutos, lenha, caça) e a exploração da terra para uso humano (pastos, agricultura e silvicultura) (TABARELLI et al., 2005).

Estudos genéticos de populações em regiões fragmentadas do bioma Mata Atlântica podem conduzir novas perspectivas conforme à sobrevivência da vegetação remanescente ou reflorestada. As populações que compõem esses fragmentos estão subordinadas a um aumento na taxa de autofecundação e no cruzamento de indivíduos aparentados, levando a um aumento da endogamia (HANSON et al., 2008). A endogamia está diretamente relacionada com a redução da heterozigosidade e da adaptabilidade das espécies, aumentando a probabilidade de extinção dessas populações (MATTHIES et al., 2004; REED, 2005).

O bioma Mata Atlântica é o ecossistema brasileiro que foi mais prejudicado pelos ciclos econômicos da história do país que gerou grandes impactos ambientais ao bioma. A devastação da Mata Atlântica acontece desde o primórdio da colonização europeia, próximos à região costeira, resultado da ocupação humana nas primeiras regiões territoriais e a extração do pau-brasil (SOUZA, 2009). Após a colonização, o bioma foi seguido de impactos dos diferentes ciclos de exploração, como o do ouro, o da cana-de-açúcar, o do café e de outras atividades agropecuárias. O progresso de outras atividades econômicas, como o crescimento da industrialização e a crescente urbanização sem planejamento prévio impulsionada pela especulação imobiliária, também colaborou para a drástica redução da vegetação natural (FUJIHARA et al., 2009; LEÃO, 2012).

O bioma Mata Atlântica proporciona diversas alternativas de práticas econômicas, que não se resume à devastação do biossistema. Algumas práticas são o uso de plantas para produção de remédios, matérias-primas para a produção de vestimentas, corantes, essências de perfumes, assim como insumos para a indústria alimentícia, exploração de árvores por meio de corte seletivo para a produção de móveis certificados (manejo sustentável), ecoturismo e, mais recentemente, o mercado de carbono (CASTELUCCI, 2015).

Atualmente, vivem aproximadamente 145 milhões de pessoas em áreas anteriormente ocupadas por esta floresta (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2015), sendo que ainda é possível encontrar regiões que mantêm grande parte de suas características faunísticas e florísticas preservadas e intactas (GUIX et al., 1992). De acordo com dados do IBGE (2014), atualmente, vivem na Mata Atlântica quase 72% da população brasileira, que corresponde a 61% dos municípios existentes no Brasil.

O resultado atual é a perda de quase a totalidade das florestas originais intactas e o contínuo desmatamento dos remanescentes florestais existentes, fazendo com que o bioma Mata Atlântica esteja em péssima posição de destaque no mundo. Trata-se de um dos conjuntos de ecossistemas mais ameaçados de extinção do planeta (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2015; INEP, 2001). As maiores taxas de desflorestamento ocorreram nas últimas três décadas; 11.650 km² de florestas foram perdidos nos últimos 35 anos (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2015).

A maior porção remanescente de Mata Atlântica está localizada na costa dos estados de São Paulo e do Paraná devido ao relevo irregular da Serra do Mar e Serra de Paranapiacaba, provável reflexo do difícil acesso à essas áreas e também devido à essas áreas serem impróprias para práticas agrícolas (LEITÃO FILHO, 1994). O Parque Estadual da Serra do Mar (PESM) é a maior área de proteção integral do litoral brasileiro sendo também maior área protegida do bioma Mata Atlântica no Brasil. São 315.390 hectares que fazem parte de 23 municípios, distribuídos do norte ao sul do estado de São Paulo. O parque representa o único corredor biológico íntegro interligando os remanescentes florestais do sul do estado do Rio de Janeiro aos remanescentes do Vale do Ribeira e Paraná, viabilizando a conservação dos fluxos gênicos entre os remanescentes (ANDREOTE, 2014).

Os remanescentes do bioma Mata Atlântica ainda continuam a ser devastados pela extração de lenha, exploração madeireira ilegal, coleta de plantas e produtos vegetais, e invasão por espécies exóticas (GALETTI; FERNANDEZ, 1998; TABARELLI et al., 2004). A maior parte das espécies ameaçadas de extinção no Brasil habitam a Mata Atlântica; são

mais de 530 espécies de plantas, aves, mamíferos, répteis e anfíbios (TABARELLI et al., 2005).

Uma série de medidas são necessárias para assegurar a conservação da biodiversidade dos remanescentes do bioma Mata Atlântica, com destaque para o controle da deterioração da fauna e flora, a integração dos diversos instrumentos regulatórios, políticas públicas e o estabelecimento de redes de paisagens sustentáveis na região, ou seja, os corredores de biodiversidade (TABARELLI et al., 2005). Em 2012, foi implementado o novo código florestal com intuito de reforçar a proteção e a função socioambiental das florestas nativas em propriedades e posses privadas (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2015).

A grande riqueza de espécies frutíferas nativas encontradas na Mata Atlântica que são consumidos tipicamente em pequena escala pela população local devem ser identificadas, estudadas e utilizadas, proporcionando uma melhor qualidade de vida da população local, pelo cultivo e comercialização dos mesmos (SOUZA, 2009).

2.2 A família *Myrtaceae*

A família *Myrtaceae* possui aproximadamente 131 gêneros e cerca de 4.620 espécies dispersas pelo mundo (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2017). No Brasil, são encontradas aproximadamente 1200 espécies pertencentes a família *Myrtaceae*, distribuídas em 25 gêneros (COSTA, 2009). As mirtáceas se destacam entre as famílias com grande potencial econômico a serem exploradas, pois, englobam numerosas espécies frutíferas (LANDRUM; KAWASAKI, 1997). As características comuns da família são: folhas inteiras, opostas ou alternadas, com glândulas oleíferas no limbo, nervura submarginal, com estruturas muito pequenas com forma de escama localizadas no caule junto a bainha das folhas chamadas de estípulas. As flores, em geral, são hermafroditas, possuem maior número de estames do que de pétalas, classificadas como polistêmones, pétalas brancas e de simetria radial (MARCHIORI; SOBRAL, 1997).

A família *Myrtaceae* está distribuída em todo hemisfério sul, sendo que as maiores ocorrências de espécies desta família são encontradas na Austrália ocidental, sudeste asiático, no Cerrado e na Mata Atlântica do Brasil, com baixa representação na África (WILSON et al., 2001; GRATAPAGLIA et al., 2012). No bioma Mata Atlântica, as espécies desta família geralmente não produzem madeiras valiosas, mas contém diversas espécies frutíferas comercialmente relevantes, tais como a goiabeira, a jabuticabeira e a pitangueira, e também as frutíferas nativas como uvaia, cambuci, grumixama e cereja do rio grande (SOUZA, 2009).

De acordo com a classificação proposta por Gemtchüjnicov (1976) e Legrand & Klein (1997), a família foi classificada em duas subfamílias: *Leptospermoideae*, representada por espécies com ocorrência na Austrália e Polinésia que possuem frutos secos do tipo cápsula, arquênio e pixídio, e *Myrtoideae*, cujas plantas apresentam frutos carnosos, geralmente baciformes, com ocorrência nas Américas, com mais de 17 tribos. A subfamília *Myrtoideae*, contém a tribo *Myrteae*, a qual compreende as subtribos *Eugeniinae*, *Myrciinae* e *Myrtinae* definidas por Berg (1857 – 1859) quanto a morfologia externa do embrião (MCVAUGH, 2009). Wilson et al. (2005), propuseram uma nova classificação infra-família *Psiloxylodeae*, com apenas duas tribos.

Todos os representantes neotropicais da família *Myrtaceae* encontram-se, atualmente, circunscritos na subfamília *Myrtoideae*, tribo *Myrteae*, com ocorrência em toda a América tropical e subtropical (COSTA, 2009; MCVAUGH, 2009). A tribo *Myrteae* é uma das mais diversificadas da família *Myrtaceae*, e é composta por aproximadamente 49 gêneros e cerca de 2500 espécies (LUCAS et al., 2007). A tribo é uma das mais importantes do Brasil, destacando-se com mais de uma centena de espécies encontradas em território brasileiro (LANDRUM; KAWASAKI, 1997).

A tribo *Myrteae* engloba plantas lenhosas, arbustivas ou arbóreas, de folhas inteiras, opostas, venação cujas nervuras laterais surgem em um único ponto e percorrem toda extensão da lâmina foliar em arcos convergentes e com nervura marginal. Contém múltiplas glândulas, sob aspecto de minúsculos pontos translúcidos nas folhas, flores, frutos e sementes, que resultam à família o peculiar aroma “mirtáceo” (de goiaba, pitanga e demais). O tronco e os ramos podem ser do tipo laminado, ou escamoso, sendo que a troca do tronco acontece ao longo do ano (ROMAGNOLO, 2009).

Os gêneros mais expressivos, com maior número de espécies são *Eugenia* (1000), *Myrciaria* (760), *Psidium* (92) e *Compomanesia* (37) (GOVAERTS et al. 2008). De acordo com levantamentos florísticos feitos em diversos tipos de ambientes, desde o cerrado até as formações florestais, a família *Myrtaceae* se destaca como a mais importante em riqueza de espécies, e dentro de um contexto mundial, a família está entre as mais ricas em diversidade de espécies vegetais e endemismos da América do Sul (KAWASAKI, 1989; CASTRO et al. 1999; MYERS et al., 2000; OLIVEIRA-FILHO; FONTES, 2000).

A família *Myrtaceae* é dominante em várias formações vegetais do Brasil, principalmente, no bioma Mata Atlântica, que corresponde aproximadamente á 50 espécies que podem ocorrer sintopicamente, isto é, com espécies idênticas em termos de morfologia e comportamento (TABARELLI; MANTOVANI, 1999; GUILHERME et al., 2004). Na

maioria dos remanescentes florestais do bioma Mata Atlântica, é a família que se destaca com maior número de espécies e indivíduos (MORI et al., 1983; TABARELLI; MANTOVANI, 1999).

Todas espécies de mirtáceas brasileiras possuem frutos carnosos, das quais sementes são potencialmente dispersas por vertebrados frugívoros (LANDRUM; KAWASAKI, 1997). A família *Myrtaceae* possui espécies nativas com interesses econômicos diversificados. Seus frutos comestíveis são ricos em vitaminas e consumidos tanto por humanos como por diversas espécies de pássaros e de mamíferos. Os frutos também são usados na produção de fármacos e de cosméticos, doces caseiros, sorvetes, aguardente, licores e refrescos (BARROSO et al., 1994; LEÃO, 2012).

Algumas espécies de mirtáceas que fazem parte dos gêneros *Psidium* e *Eugenia* são considerados de grande relevância ecológica, por apresentarem características apícolas, produzem frutos apreciados pela fauna silvestre e têm sido muito indicados para a vegetação de áreas perturbadas (BARROSO et al., 1994; LEÃO, 2012). Dentre as espécies da família das mirtáceas, algumas se destacam como o gênero *Eucalyptus*, amplamente utilizado como produtor de madeira e óleos essenciais; *Callistemon* e *Mellaleuca* destinadas como plantas ornamentais; algumas espécies como o cravo da índia *Syzygium aromaticum* e pimenta da jamaica (*Pimenta dioica*) utilizadas na culinária (ROMAGNOLO, 2009).

Na década de 90, 38 espécies de *Myrtaceae* foram incluídas na lista de espécies alvo para a conservação e restauração da biodiversidade do estado de São Paulo, sendo que essa seleção foi feita com base em listas de espécies ameaçadas de extinção (RODRIGUES et al., 2008). Espécies nativas estão desaparecendo, sendo que algumas delas são extintas antes mesmo que se tenha conhecimento básico de sua biologia (LANDRUM; KAWASAKI, 1997; VALLILO et al., 2005).

2.3 Cambuci

O gênero *Campomanesia*, o qual pertence o cambuci, está incluído na subfamília *Myrtoideae*, é exclusivo da América do Sul e possui 41 espécies identificadas (CRONQUIST, 1968; LANDRUM, 1986; SOBRAL et al., 2017). O gênero possui elevada concentração de espécies no Nordeste e Sudeste do Brasil (KAWASAKI; LANDRUM, 1997).

O cambuci ou cambucizeiro é uma espécie frutífera silvestre nativa do Brasil representada por vegetais de porte arbustivo ou arbóreo, geralmente, conhecidas como “guabiroba” ou “gabiroba” (JOHNSON; BRIGGS, 1984; LANDRUM, 1986).

O nome “cambuci” é de origem indígena, do ramo linguístico Tupi-Guarani, que remete à forma de seus frutos, que são perecidos com potes de cerâmicas indígenas que recebiam o mesmo nome, às vezes grafado “cambuchi” (DIAZ et al., 1991). Devido à sua grande ocorrência na cidade de São Paulo no século XX, deu-se o nome do tradicional bairro da cidade, o bairro do Cambuci (CORDEIRO, 2015). O cambuci é considerado uma espécie ameaçada de extinção, na classificação de conservação da espécie estabelecido pela IUCN (*International Union for Conservation of Nature*), devido ao desmatamento ocorrido em suas áreas de ocorrência natural.

O cambucizeiro é uma árvore relativamente pequena, que pode alcançar 4 a 5 metros de altura, tronco com 20 a 30 centímetros de diâmetro com casca fina e lisa, que se renova todos os anos. As folhas são opostas, pecioladas verde-brilhantes, na face ventral, e verde claras na face dorsal, o ápice foliar é acuminado, a base cuneiforme, e a margem é lisa (JORGE, 1992). A floração ocorre nos meses de agosto a novembro e os frutos são abundantes durante os meses de janeiro e fevereiro (LORENZI, 1992; VALLILO et al., 2005). A descrição botânica do cambuci é apresentada na Figura 2.

Figura 2. Cambuci (*Campomanesia phaea*). (A) ramo com flores e botão aberto. (B) botão da flor fechado. (C) corte longitudinal do ovário mostrando dois lóculos. (D) corte transversal do ovário mostrando 12 lóculos e 2 óvulos visíveis em cada. (E) fruto maduro. (F) semente com parede locular glandular que serve como um falso revestimento da semente. (G) embrião espiral com grandes hipocotilédones e pequenos cotilédones (KAWASAKI, 1997)

O cambuci apresenta uma única floração por ano, de duração intermediária, sendo que sua estratégia de floração é do tipo “steady state”, ou seja, os indivíduos abrem poucas flores por dia, padrão descrito por Gentry (1974) (CORDEIRO, 2015). O pico de floração do cambuci ocorre no período mais quente e úmido do ano, o que garante a disponibilidade de frutos na estação mais úmida, contribuindo para a dispersão das sementes, que coincide com a época de maior atividade de vertebrados dispersores no bioma Mata Atlântica, além de serem dispersas em período favorável à germinação (SCHAIK, VAN et al., 1993; TABARELLI; PERES, 2002).

As flores de *C. phaea* são axilares e solitárias de cor branca, hermafroditas, actinomorfas, pentâmeras, numerosos estames externos a corola, dialipétalas e polistêmones (Figura 3). O sistema reprodutivo do cambuci é auto incompatível, ou seja, apresenta polinização cruzada, confirmada por testes manuais de polinização (LEÃO, 2012; CORDEIRO, 2015). Os principais polinizadores de *C. phaea* são abelhas, representadas pelos gêneros *Meliponini*, *Bombini* e *Apis* (GRESSLER et al., 2006; CORDEIRO, 2015).

Figura 3. Flor do cambuci (*Campomanesia phaea*) (CORDEIRO, 2015)

O cambuci possui ocorrência nos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (LORENZI, 2006), sendo que na vertente da Serra do Mar para o planalto paulista há grande ocorrência da espécie (LORENZI, 1992).

As folhas de cambuci contém altos teores de óleos essenciais, com elevado valor comercial para a indústria farmacêutica e de cosméticos, como o lianol que apresenta ação

analgésica e anti-inflamatória (ADATI, 2001; PEANA et al., 2006). Tanto as folhas como a casca do tronco são adstringentes e aromáticas, sendo utilizadas na elaboração de xaropes indicados para o tratamento de tosse e doenças respiratórias (LEÃO, 2012).

Os frutos do cambuci são carnosos, suculentos e comestíveis, geralmente medem de 5 a 6 cm de diâmetro, possuem casca fina e coloração verde; quando atingem a maturação, tornam-se um pouco amarelados, macios e caem ao chão (Figura 4). O consumo *in natura* é limitado devido à adstringência, forte acidez e baixo teor de carboidratos, mas apresenta potencial para industrialização por causa de seus atributos de qualidade como altas concentrações de vitamina C, minerais, fibras alimentares e auto rendimento de polpa. Os frutos são utilizados, principalmente, na forma de sucos, geleias, aromatizantes e doces em calda, além de serem considerados exóticos por possuírem interessantes propriedades aromáticas que os favorecem como agentes flavorizantes em alimentos e bebidas. Os frutos de cambuci já eram conhecidos desde o período colonial do Brasil e foram utilizados durante anos como aromatizantes de cachaças (LORENZI, 1992; VALLILO et al., 2005; SILVA et al., 2012).

Figura 4. Árvore cambuci (A) (*Campomanesia phaea*) e frutos (B e C) (CORDEIRO, 2015)

A composição físico-química do fruto de cambuci *in natura* inclui elevados teores de fibras alimentares, aproximadamente 4%, quando comparado a outras espécies da família *Myrtaceae* (VALILO et al., 2005). A polpa do cambuci apresenta alta atividade inibitória de α -amilase e a α -glicolidase, enzimas empregadas no tratamento de *diabetes mellitus* do tipo 2,

além de possuir altos teores de derivados glicosilados de quercetina e ótima capacidade antioxidante (GONÇALVES et al., 2010).

Kawasaki e Landrum (1997) classificaram o cambuci como uma frutífera nativa que possui elevado valor econômico a ser explorado. A comercialização dos frutos de cambuci ainda é restrita aos locais de ocorrência da espécie onde há tradição da produção da fruta, sendo que ainda não constam dados no censo agropecuário do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (CORDEIRO, 2015). Organizações não governamentais e cooperativas, como o Instituto Auá de Empreendedorismo Socioambiental, o Instituto H&H Fauser e a Cooper Cambucy da Serra têm incentivado o cultivo de cambuci com o intuito de apoiar o desenvolvimento sustentável da fruta, estimular a cultura e a conservação do patrimônio histórico, artístico e cultural como também fortalecer a renda dos produtores locais (DELLAQUA, 2016).

No estado de São Paulo, desde 2009, acontece a tradicional “Rota Gastronômica do Cambuci”, que, anualmente, percorre diversas cidades produtoras da fruta. O evento é realizado em parceria entre o Instituto Auá e os produtores de cambuci, que desenvolvem uma série de atividades gastronômicas, culturais, turísticas e de lazer nas cidades participantes. O festival tem como propósito principal promover o desenvolvimento sustentável das regiões de origem do cambuci (INSTITUTOAUA, 2017).

2.4 Diversidade genética

A diversidade biológica pode ser categorizada em três principais categorias: a diversidade de ecossistemas, a diversidade de espécies e a diversidade genética dentro das espécies (FRANKHAM et al., 2010). A diversidade genética possibilita que os processos evolutivos se mantenham nas populações naturais, e consequentemente, sustentem a capacidade de adaptação a mudanças ambientais constantes na natureza (DIAZ, 2013). A preservação da diversidade genética é indispensável para a sobrevivência das espécies, ou seja, quando uma espécie possui baixa diversidade genética esta certamente estará mais suscetível a pragas, doenças e estresses ambientais, que irá resultar em menores chances de sobrevivência (ELLSTRAND; ELAM, 1993; HAMRICK, 2004). A diversidade genética é indispensável para a sustentabilidade e estabilidade dos ecossistemas (RAJORA; PLUHAR, 2003).

A análise da diversidade genética em populações naturais resulta na descrição dos níveis em que a variação genética é medida dentro das populações, como também a forma que a variação genética é dividida entre as mesmas (HAMRICK et al., 1983; LOVELESS & HAMRICK, 1984). A genética de populações se tornou uma ferramenta que possibilita a descrição da diversidade genética em populações, como também os mecanismos de manutenção desta diversidade (NEI, 1987). A base da conservação das espécies é dependente da manutenção da diversidade genética, sendo que a caracterização desta é fundamental para o estabelecimento de práticas conservacionistas efetivas (YEEH et al., 1996).

A mutação é o fator evolutivo responsável pelo aumento da diversidade genética nas populações, inserindo novos alelos devido aos erros surgidos ao acaso durante a replicação do DNA. Entretanto, a deriva e a seleção natural tendem a diminuir a diversidade, e a migração permite a dispersão dos novos alelos a outras populações (ALLENDORF; LUIKART, 2007). O tamanho da população, a distribuição geográfica e o sistema de reprodução da espécie também são fatores principais que influenciam nos padrões de distribuição das frequências alélicas (HAMRICK; GODT, 1990).

A detecção de fenômenos evolutivos de uma determinada população é possível por meio de análises do equilíbrio de Hardy-Weinberg. De acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, as frequências alélicas irão se manter constantes pelas gerações na ausência de mutação, migração e seleção natural (EDWARDS, 2008). Desvios desse equilíbrio indicam que fenômenos evolutivos estão alterando a diversidade genética da população (DIAZ, 2013). A endogamia é outro fenômeno que altera o equilíbrio de Hardy-Weinberg, pois, altera as frequências de heterozigotos e favorece ao aumento de alelos em homozigose que pode levar à deriva genética e com isso à perda de alelos (FRANKHAM et al., 2010).

Define-se estrutura genética como a distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações. De uma forma mais ampla, a estrutura genética corresponde à distribuição não arbitrária dos alelos ou genótipos no tempo e no espaço (BROWN, 1978; HAMRICK, 1982). A estrutura genética e o seu padrão espacial dentro das populações são elementos importantes dos processos evolutivos de populações naturais de plantas (EPPERSON, 1990).

A elucidação do nível e da distribuição da diversidade genética dentro de uma espécie podem resultar em uma melhor compreensão de sua história ecológica e evolutiva (HAMRICK; GODT, 1996). Espécies arbóreas de florestas tropicais, geralmente, revelam alta proporção de *loci* polimórficos resultando em um alto nível de diversidade genética dentro de populações e uma baixa diversidade genética entre as populações (BERG & HAMRICK, 1997). De acordo com Weir (1990), a forma como a diversidade genética é compartilhada

dentro e entre as populações é de grande interesse para a conservação dos recursos genéticos e indispensável para o manejo racional dos recursos de populações naturais.

A diversidade genética, ou seja, variação genética dentro da espécie, e a estrutura genética de populações que avalia a distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações podem ser caracterizadas utilizando tanto caracteres fenotípicos (características agromorfológicas em plantas) como também pela mensuração da variação molecular, especificamente de sequências de moléculas que carregam informações genéticas, como DNA (HAMRICK et al., 1979).

Geralmente, o tamanho populacional e a diversidade genética são diretamente proporcionais, ou seja, quanto maior a população maior será a diversidade genética dentro da população, conseqüentemente, maiores serão as diferenças genéticas dos indivíduos desta população (LOVELESS & HAMRICK, 1984; ZANETTI; CAVALLI, 2003). Um dos principais fatores preocupantes de uma pequena população é sua alta suscetibilidade em relação à deriva genética, o que resulta em baixa diversidade, sendo que em grandes populações, o efeito da deriva genética sobre a diversidade é praticamente desprezível (FERNANDES, 2008).

A determinação dos níveis de diversidade genética é de suma importância, pois, é responsável pela manutenção do equilíbrio e estabilidade dos ecossistemas, e constitui fonte inestimável de recursos econômicos. Os conhecimentos dos níveis de diversidade genética têm sido empregados como ferramentas para contribuir tanto com a adoção de estratégias de manejo e de conservação genética como também se tornou indispensável para o melhoramento genético (PEAKALL et al., 2003; BOTREL; CARVALHO, 2004; ZIMBACK et al., 2004; TAN et al., 2005; RENU-MORATA et al., 2005). Levando em consideração as altas taxas de desflorestamento e mudanças climáticas globais, é de extrema importância estudos com essa finalidade já que a caracterização da diversidade genética é indispensável para o estabelecimento de práticas conservacionistas realmente efetivas (YEEH et al., 1996; FERNANDES, 2008).

A diversidade genética entre populações pode ser caracterizada pelos índices porcentagem de *loci* polimórficos (P), número médio de alelos por *loco* (A), heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e), heterozigosidade observada (H_o) e o índice de fixação da espécie (f) (BERG; HAMRICK, 1997; ALLENDORF e LUIKART, 2007).

A deterioração dos habitats e a desintegração das populações naturais podem gerar conseqüências irreversíveis para a manutenção da diversidade genética das espécies, devido à redução da diversidade genética e da habilidade de adaptação às mudanças ambientais

(BARRET; KOHN, 1991). O conhecimento dos processos microevolutivos dentro das populações de plantas nativas têm prosperado, impulsionado pelos estudos da organização da diversidade ou de estrutura genética das populações, que direcionam a melhoria das estratégias de domesticação, manejo e conservação dessas espécies (CARTHEW, 1993).

A diversidade genética é estimada por meio de marcadores classificados como morfológicos, por estimar a diversidade genética por meio de características fenotípicas e moleculares que estimam a diversidade genética através de análise direta do DNA, ou indiretamente, pela sequência de aminoácidos de uma proteína ou pelo RNA (HOSHINO et al., 2012; DIAZ, 2013). Os marcadores moleculares destacam-se nos estudos de diversidade genética de espécies arbóreas tropicais (FINKELDEY; HATTEMER, 2007).

2.5 Marcadores moleculares

Com a descoberta da molécula de DNA e a elucidação do código genético, a genética se tornou uma ferramenta indispensável em pesquisas envolvendo conservação de recursos naturais (MARTINELLI, 2001). Com o passar do tempo, as técnicas foram aprimoradas a fim de desvendar os mecanismos genéticos presentes nos complexos sistemas que compõem os seres vivos (BAJAY, 2014). A partir da década de 70, com o avanço das técnicas de biologia molecular, foi possível desenvolver metodologias de marcadores moleculares baseadas em polimorfismo ao nível de sequência de DNA, que se tornou uma poderosa ferramenta para entender a estrutura e organização da diversidade genética (FIGUEIRA; CASCARDO, 2001).

Um marcador molecular é considerado um marcador genético quando obrigatoriamente apresenta comportamento mendeliano, ou seja, os alelos de cada *loco* segregam na meiose e os alelos de *loci* distintos são herdados de forma independente (FERREIRA et al., 2007). Os marcadores genéticos podem ser morfológicos, bioquímicos ou moleculares, apesar de que os dois primeiros tipos tiveram sua grande importância nos estudos genéticos. Com o aprimoramento das técnicas biologia molecular, os marcadores morfológicos e bioquímicos estão sendo substituídos pelos marcadores moleculares (SCHLÖTTERER, 2004). Além disso, a substituição desses marcadores foi devido à limitação da disponibilidade e à influência do ambiente ou de outros genes no seu fenótipo (LEFEBVRE; CHÈVRE, 1995).

Os marcadores moleculares são um conjunto de métodos de detecção de variações nas sequências de DNA, ou seja, são formas de investigar os polimorfismos naturais existentes

entre os indivíduos e torná-los úteis nas diversas investigações da genética (CAIXETA et al., 2006). Esses marcadores possuem abundância genômica, possuem alta taxa de polimorfismo, especificidade dos *loci* e reprodutibilidade. Os marcadores moleculares podem ser utilizados em análises genéticas com diversas finalidades, tais como, identificação de clones, linhagens, híbridos, cultivares, paternidade, fluxo gênico, taxa de cruzamento, parentesco e na construção de mapas genéticos (BUSO et al., 2003). Também permitem mensurar a diversidade genética diretamente em nível de DNA de espécies cultivadas e não cultivadas, ou seja, vários tipos de marcadores estão disponíveis, onde cada método oferece tipos diferentes de informação (BAY, 2009).

O avanço dessas técnicas de biologia molecular tem facilitado o desenvolvimento de uma série de marcadores genéticos moleculares. A resolução e a facilidade de reprodução do uso de marcadores de DNA foram aprimoradas consideravelmente com o avanço das técnicas de hibridização dos ácidos nucleicos, PCR (reação em cadeia da polimerase) e com o sequenciamento do DNA (GROVER; SHARMA, 2014).

2.5.1 Marcadores restriction fragment length polymorphism (RFLP)

A tecnologia de marcadores de DNA começou com o desenvolvimento de marcadores de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição para a construção do primeiro mapa molecular do genoma humano (BOTSTEIN et al., 1980). A técnica de RFLP consiste em detectar polimorfismo por hibridização. Os *loci* polimórficos são detectados pela diferença no comprimento dos fragmentos gerados por restrição e revelados a partir da hibridização com sondas marcadas. Estas sondas podem ser insertos clonados a partir da construção de bibliotecas genômicas ou de cDNAs (SCHLÖTTERER, 2004).

Os marcadores RFLP são co-dominantes, identificam *loci* específicos, são muito informativos e viáveis para distinguir diferentes genótipos (GEBHARDT et al., 1989). Esse tipo de marcador foi utilizado em larga escala para mapeamento de genoma em plantas, marcação de genes, compreensão da dinâmica populacional e o estabelecimento de relações taxonômicas (GROVER; SHARMA, 2014).

Algumas limitações da técnica de RFLP motivaram o desenvolvimento de tecnologias alternativas. A técnica exige altas quantidades de DNA, espécies filogeneticamente próximas normalmente podem possuir os mesmos alelos, uso de radiatividade, tempo extensivo para

realização da técnica e uso restrito no mapeamento genético, uma vez que as regiões repetitivas no genoma são ignoradas nas análises devido à única cópia (SIRACUSA et al., 1991; LIU; FURNIER, 1993). Essas limitações e a dominância das tecnologias baseadas em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em anos posteriores resultaram na descontinuidade do uso dos marcadores RFLP, apesar de que seja necessário reconhecer que a base de vários avanços na genômica, transcriptômica e até mesmo nos marcadores moleculares aprimorados como microssatélites, foram estabelecidos a partir da técnica de RFLP (CHAMBERS et al., 2014).

2.5.2 Marcadores *random amplified polymorphic DNA* (RAPD)

Após a invenção da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) no início da década de 90, a capacidade de visualização de *loci* genômicos, sem a necessidade de marcação e hibridização possibilitou o desenvolvimento de uma série de marcadores moleculares, sendo que um deles é o RAPD (MULLIS; FALOONA, 1987; WILLIAMS et al., 1990).

Amplamente utilizado, *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) é uma técnica simples que se baseia na amplificação de segmentos arbitrários de DNA ao longo do genoma, a partir de iniciadores curtos de 10 pb. Toda vez que houver o anelamento dos iniciadores em sentidos opostos, dentro de aproximadamente 2000 pb, ocorre a amplificação do segmento entre eles, gerando vários *loci* ao mesmo tempo; a detecção é feita por eletroforese em gel de agarose. Os polimorfismos resultam da variação do comprimento na sequência alvo situada entre os locais de ligação do iniciador (WILLIAMS et al., 1990).

Os marcadores RAPD são utilizados para a construção de mapas genéticos e têm sido amplamente utilizados na triagem de polimorfismos em vários *loci* simultaneamente (GRATTAPAGLIA; SEDEROFF, 1994). A técnica requer uma pequena quantidade de DNA, não é um ensaio radiativo e pode ser realizada em poucas horas e, geralmente, são obtidos numerosos marcadores que, frequentemente, estão distribuídos por todo o genoma. Além disso, requer menos conhecimento técnico (GROVER; SHARMA, 2014).

Embora o ensaio de RAPD tenha solucionado a maioria dos problemas associados ao RFLP, os marcadores RAPD possuem herança dominante e os indivíduos heterozigóticos não podem ser distintos dos homozigóticos. Ainda, devido ao uso de iniciadores curtos, a temperatura de anelamento da reação de PCR deve ser baixa para que haja o anelamento correto na sequência alvo, o que torna a amplificação sensível a variações, dificultando a sua

reprodutibilidade. Além disso a escolha dos reagentes da PCR e da enzima *taq* polimerase também é uma fonte ou causa de variação experimental (SCHIERWATER; ENDER, 1993; SKROCH; NIENHUIS, 1995).

2.5.3 Marcadores inter-simple sequence repeat (ISSR)

Esse tipo de marcador é obtido através de reações de PCR com um único iniciador de oligonucleotídeo longo que anela em qualquer uma das extremidades do DNA. Foi descrito pela primeira vez por Meyer et al. (1993). As repetições de sequências inter-simples (ISSR ou MP-PCR) combinam essencialmente os benefícios dos marcadores RAPD com reprodutibilidade e especificidade. A reprodutibilidade é alcançada pelo fato de serem utilizados iniciadores mais longos na reação de PCR e temperaturas de anelamento mais elevadas, que torna o iniciador mais específico. Como nos marcadores RAPD, não é necessário nenhum conhecimento prévio da sequência alvo para desenvolver marcadores ISSR, podendo assim ser utilizado facilmente em espécies não modelo (MEYER et al., 1993).

A abundância de microssatélites presente nos genomas e sua hiperdiversidade entre os indivíduos da mesma espécie garante a utilidade dos marcadores ISSR (ZIETKIEWICZ et al., 1994). A técnica de ISSR pode ser facilmente modificada para desenvolver iniciadores específicos de alta resolução que podem ser usados para isolar sequências de minissatélites e microssatélites (SIEBERT et al., 1995; GROVER et al., 2012).

2.5.4 Marcadores amplified fragment length polymorphism (AFLPs)

Os marcadores AFLPs baseiam-se na variação do comprimento dos fragmentos de restrição, e os fragmentos são amplificados seletivamente via PCR. Os fragmentos gerados pela digestão do DNA são feitos a partir de duas enzimas de restrição, uma de corte raro e outra de corte frequente. Os fragmentos são ligados a adaptadores (sequências específicas) que se ligam às suas extremidades. Os fragmentos são amplificados por PCR utilizando iniciadores complementares às sequências dos adaptadores. A separação dos fragmentos é feita em gel de poliacrilamida e os polimorfismo são esperados devido a mutações nos locais

de reconhecimento de restrição, na sequência adjacente ao sítio de restrição e na inserção ou deleção dentro dos fragmentos amplificados (VOS et al., 1995).

A alta reprodutibilidade, geração rápida e alta frequência de polimorfismos identificáveis tornam a técnica de AFLP atraente para determinar *linkages* através de indivíduos de populações segregantes (ALEXANDER et al., 2012). Os marcadores AFLPs são mais reprodutíveis do que os RAPDs, portanto, são mais confiáveis para estudos populacionais e genéticos (SAVELKOUL et al., 1999). Os AFLPs são distribuídos por todo genoma, assim, são adequados para a construção de mapas de ligação genética (BECKER et al., 1995). No entanto, a quantidade de informação genética polimórfica dos marcadores AFLP é, geralmente, menor do que os marcadores microsatélites (PEJIC et al., 1998).

Os marcadores AFLPs se tornaram uma técnica popular em pesquisas de genética de populações e diversidade genética em espécies de animais, vegetais e microbianas (SAVELKOUL et al., 1999). Esse tipo de marcador apresenta herança mendeliana, sendo assim a técnica possui grande potencial para ser utilizada em diferentes áreas da genética e melhoramento de plantas (CAIXETA et al., 2006). Os *loci* polimórficos de AFLP são, geralmente, pontuados para a presença ou ausência de bandas, e os indivíduos heterozigotos são difíceis de identificar (BONIN et al., 2007). Cada gel é capaz de revelar a variação de até uma centena de fragmentos (*loci*) por meio de uma única combinação de iniciadores, gerando um elevado valor informativo do AFLP, a qual constituiu uma das grandes vantagens desse marcador em relação aos demais. (VUYLSTEKE et al., 1999).

2.5.5 Marcadores Internal Transcribed Spacer (ITS)

A região do genoma que codifica os componentes do RNA dos ribossomos (rRNA) é classificada como DNA ribossomal (rDNA), constituem unidades de transcrição localizados em cromossomos nucleares que são organizados para formar uma família multigênica que consiste em um número elevado de cópias repetidas em tandem (VILLALOBOS et al., 2014).

A região que compõe o *loco* rDNA é constituída por três genes (18S, 5,8S e 25S), que são responsáveis por codificarem o rDNA e dois espaçadores transcritos separados pelo gene rRNA 5,8S que não é codificado (ITS1 e ITS2) (Figura 5). Essas regiões espaçadoras possuem taxa de mutação mais alta que as regiões codificadoras dos ribossomos pelo fato de que as mutações que ocorrem nas regiões ITS1 e ITS2 são consideradas mutações neutras, ou

seja, mutações que alteram a sequência de DNA mas não altera a sequência de aminoácidos da proteína ou do RNA funcional (BOONRUANGROD et al., 2008). Ambos os espaçadores são incorporados ao ribossomo maduro, mas sofrem uma clivagem específica durante a maturação dos RNAs ribossômicos (HOUSELEY et al., 2007).

Figura 5. Ilustração da região organizadora de nucléolo, apresentada em amarelo, contém as regiões codificadoras 18S, 5.8S e 26S e os espaçadores transcritos ITS1 e ITS2, responsáveis pela estrutura secundária do transcrito (EDGER et al., 2014)

As regiões codificadoras de rDNA são altamente conservadas e a taxa de mutação é muito baixa, permitindo a sua utilização em níveis hierárquicos mais elevados (COOKE et al., 2000). Ao contrário, as regiões ITS apresentam alta taxa de mutação e, consequentemente, evoluem rapidamente, apresentando alto polimorfismo, o que torna essas regiões vantajosas nos estudos filogenéticos de gêneros e espécies (BALDWIN et al., 1995).

As vantagens das regiões espaçadoras são: herança biparental, em comparação com os marcadores de cloroplasto e mitocôndrias herdados da mãe; fácil amplificação por PCR com vários iniciadores universais disponíveis para diferentes tipos de organismos; estrutura multicópia; tamanho moderado da região permite o sequenciamento. As regiões ITS1 e ITS2 são adequadas para estudos evolutivos na espécie ou nível genérico (BALDWIN et al., 1995; MAGGINI et al., 1998). Os espaçadores transcritos variam de tamanho de 500 a 700 pares de base devido a mutações pontuais em angiospermas. As regiões ITS não são incorporadas durante a maturação dos RNA ribossômicos, mas sofrem clivagem durante a maturação pela própria estrutura secundária dos ITS (EDGER et al., 2014).

A informação genética fornecida pelas regiões ITS1 e ITS2 na pesquisa filogenética é considerada significativa e pode ser utilizada em diferentes níveis taxonômicos, uma vez que essas regiões específicas dos *loci* rDNA são diferencialmente conservadas. As regiões espaçadoras ITS1 e ITS2 possuem informações úteis para a sistemática vegetal de espécies para nível genérico, sendo que essas regiões também têm sido utilizadas em estudos de

especiação e biogeografia, devido à alta diversidade da sequência e divergência da mesma (POCZAI; HYVÖNEN, 2010).

2.5.6 Marcadores Microssatélites

Microssatélites são conhecidos como repetições simples de sequência (SSRs – *Simple sequence repeats*) ou repetições curtas em tandem (STRs - *short tandem repeats*) e representam uma classe de sequências repetitivas amplamente distribuídos em todos os genomas. Os microssatélites são constituídos de sequências curtas, de 1 a 6 nucleotídeos, repetidas em linha (tandem) que são correspondentemente designados como repetições de mono, di, treça, penta ou hexa nucleotídeo (GROVER; SHARMA, 2014). Os microssatélites possuem distribuição ao longo de todo o genoma, especialmente, na eucromatina dos organismos eucariotos, e no DNA nuclear e organelar, tanto na região codificadora como nas regiões não codificadoras (PHUMICHAJ et al., 2015).

De um modo geral, pode-se afirmar que a ocorrência de microssatélites é menor nas regiões codificadoras, devido ao fato de que os microssatélites têm uma taxa de mutação elevada, que pode comprometer a expressão gênica. Pesquisas indicam que, em regiões codificadoras, existe uma predominância de microssatélites com motivos genéticos do tipo tri e hexanucleotídico, resultado da pressão de seleção contra mutações que alteram o quadro de leitura (ZHANG et al., 2004; XU et al., 2013). A distribuição preferencial dos microssatélites nas regiões não codificadoras protege-os da ação da seleção natural, tornando-os seletivamente neutros e úteis para estudos de genética de populações (EISEN, 1999).

Os polimorfismos observados a partir dos microssatélites surgem a partir de um mecanismo de mutação causado pelo deslizamento da DNA polimerase, chamado de *slippage*, durante a replicação do DNA ou por erros de recombinação (*crossing-over*) causado pelo pareamento errôneo destas sequências durante os quiasmas, o que gera novos alelos com números diferentes de unidades repetitivas, seja tanto pelo aumento como pela diminuição das unidades repetitivas. Assim, quanto maior for a repetição, maior será a frequência de mutação, enquanto que repetições mais curtas têm uma menor frequência de mutação (WEBER; MAY, 1989; VIEIRA et al., 2016). Os microssatélites apresentam alta taxa de mutação, variando de 10^{-6} a 10^{-2} por geração (EISEN, 1991).

Os marcadores microssatélites podem ser classificados de acordo com o motivo como: perfeito, se composto inteiramente de repetições de um único motivo; imperfeito, se um par de bases não pertencente ao motivo ocorre entre repetições; interrompido, se uma sequência de alguns pares de bases é inserida no motivo; composto, se formado por múltiplos motivos adjacentes repetitivos (OLIVEIRA et al., 2006; MASON, 2015).

Os microssatélites são considerados ideais para estudos em plantas por possuírem características desejáveis tais como: são abundantes no genoma, fáceis de serem utilizados, codominantes, *loci* multialélicos, universais, produzem resultados confiáveis e reprodutíveis. Os padrões de polimorfismo exibidos pelos marcadores microssatélites são maiores do que em qualquer outro sistema de marcadores já desenvolvidos (GROVER; SHARMA, 2014). O desenvolvimento dos marcadores microssatélites proporcionou uma maior demanda do uso consistente de marcadores moleculares, pelo fato de apresentarem maior conteúdo informativo por *loco* gênico dentro todas as classes de marcadores. Os marcadores microssatélites podem ser avaliados rapidamente em um grande número de indivíduos para um grande número de *loci* em pouco tempo (WU; TANKSLEY, 1993; NAZARENO et al., 2011). Os marcadores microssatélites são facilmente reprodutíveis através da PCR, além de que uma vez desenvolvidos, podem ser compartilhados entre centros de pesquisas (NAZARENO et al., 2009).

Quando se iniciou o uso dos marcadores microssatélites, o procedimento era trabalhoso, exigindo rastreio de milhares de clones genômicos através da hibridização de sondas de microssatélites radiomarcadas de curta duração. Além disso, a recuperação de clones positivos de microssatélites era baixa e o alto custo para o desenvolvimento e uso dos marcadores microssatélites era visto como uma desvantagem destes marcadores (CHEN et al., 1997; GROVER et al., 2009). Para o desenvolvimento dos iniciadores específicos, a técnica de bibliotecas genômicas pode ser empregada (SNUSTAD; SIMMONS, 2001). Todavia, as mesmas podem resultar em baixa eficiência. Recentemente, foi desenvolvida a técnica de biblioteca genômica enriquecida de microssatélites que garante maior número de clones contendo regiões de microssatélites e uma maior probabilidade de desenvolvimento do marcador, porém cada espécie possui uma eficiência distinta de recuperação de sequências contendo microssatélites (HE et al., 2003; GROVER; SHARMA, 2014).

Dos diferentes métodos de enriquecimento de bibliotecas genômicas de microssatélites, o que resulta em maior eficiência e custos reduzidos para o uso da técnica tem sido o protocolo de captura de biotina-estreptavidina desenvolvidos por Kijas et al. (1994) e Billote et al. (1999), em que os adaptadores são ligados aos fragmentos de DNA selecionados

pelo tamanho e submetidos à amplificação por PCR. Os produtos amplificados são hibridizados com sondas de microssatélites marcadas com biotina. Os produtos genômicos enriquecidos são novamente amplificados via PCR e clonados (WARDILL et al., 2004). A grande popularidade dos marcadores microssatélites levou ao desenvolvimento de vários *softwares* especializados na avaliação de microssatélites, que poderiam prever o potencial polimórfico dos *loci* de microssatélites identificados (LECLERCQ, 2007; LIM et al., 2013).

Os marcadores microssatélites são ideais para estudos de genética de populações, constituindo uma ferramenta indispensável na análise populacional, construção de mapas genéticos, análise de paternidade, fluxo gênico, estudos ecológicos e biologia da conservação (BREISSAN et al., 2012). Em particular, os marcadores microssatélites são úteis para estudos em espécies selvagens como: diversidade genética medidos com base na distância genética, estimar o fluxo de genes e taxas de cruzamento e também em estudos evolutivos (KALIA et al., 2011). Por outro lado, para plantas cultivadas, os microssatélites são usados para mapeamento de *loci* envolvidos em traços quantitativos (QTL), estimar grau de parentesco entre genótipos e usado na seleção assistida por marcadores (JONAH et al., 2011).

A utilidade prática dos microssatélites foi revisada por vários autores nas décadas recentes (Jarne; Lagoda, 1996; Schlötterer, 1998; Buschiazzi; Gemmell, 2006; Guichoux et al., 2011; Gemayel et al., 2012; Senan et al 2014; Mason, 2015). De acordo com uma pesquisa feita por Vieira et al. (2016), indicando que este tipo de marcador molecular continua a ser utilizado, com alta relevância, na análise genética de plantas. Por outro lado, os marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) tendem a substituir os microssatélites em novos trabalhos desta natureza. Entretanto, os marcadores microssatélites ainda deverão ser aplicáveis em futuros estudos genéticos de plantas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Cento e quarenta e cinco acessos de cambuci (*Campomanesia phaea*) foram coletados na vertente da Serra do Mar, nas áreas de ocorrência da Floresta Costal Atlântica do Estado de São Paulo. As populações foram definidas de acordo com o município de coletas do material vegetal (Tabela 1). Ao todo, foram cinco municípios formando as seguintes populações: População 1 -Paraibuna; População 2 – Mogi das Cruzes; População 3 - Juquitiba; População 4 - Ribeirão Pires; e População 5 - Salesópolis (Figura 6).

Amostras de cada acesso de cambuci foram compostas por quatro a cinco folhas jovens, coletadas e armazenadas em tubo de centrifugação (50ml) contendo etanol 96%. Após 24 horas da coleta, a solução de etanol 96% foi trocada por uma nova solução de etanol 96% e as folhas foram armazenadas por aproximadamente 15 dias em temperatura ambiente até o momento da extração do DNA genômico (BREISSAN et al., 2014).

Figura 6. Municípios onde foram coletados os acessos de cambuci (*Campomanesia phaea*) (Google Earth, 2017)

Tabela 1. Número de indivíduos amostrados a partir de cinco populações de cambuci (*Campomanesia phaea*) no Estado de São Paulo

População	Origem	Nº de indivíduos
1	Paraibuna	52
2	Mogi das Cruzes	47
3	Juquitiba	14
4	Ribeirão Pires	22
5	Salesópolis	10

3.2 Extração do DNA genômico, quantificação e qualificação

A extração do DNA foi realizada como descrito por Sereno et al. (2006), com pequenas modificações. Tecidos foliares (50 mg) foram homogeneizados e transferidos para microtubos de 1,5 mL contendo 650 µL de tampão de extração, composto de 2% Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB); 1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl (pH 8,0); 20 mM de Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA); 1% Polivinilpolipirrolidona (PVPP); 0,2% de β -mercaptoetanol; 0,1 mg.mL⁻¹ *Proteinase K*. Os tubos com as amostras foram homogeneizados por inversão e incubados a 55° C por 60 min. Logo após, foram adicionados 600 µL de solução clorofórmio – álcool isoamílico (24:1, v/v). As misturas foram centrifugadas a 12.000 g por 5 min. Após a centrifugação, foram adicionados aos sobrenadantes 600 µL de clorofórmio – álcool isoamílico (24:1, v/v) e 200 µL de tampão de extração sem β -mercaptoetanol e *Proteinase K*. As misturas foram novamente centrifugadas a 12.000 g por 5 min. Os extratos passaram por mais uma extração orgânica, seguindo-se os passos da etapa anterior. As fases aquosas foram transferidas para novos microtubos; 600 µL de isopropanol absoluto gelado foram adicionados em cada amostra e as soluções foram incubadas a -20°C, por 1 h. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 5 min. A fase líquida das amostras foi descartada. Os pellets com DNA foram lavados com 1 mL de álcool 70% e foram ressuspensos em 30 µL de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM de EDTA, pH 8,0), contendo 10 µg.mL⁻¹ RNase.

A qualidade do DNA genômico foi avaliada por eletroforese (2 V.cm⁻¹) em gel de agarose 0,8% revelado com *SYBRgold* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts,

EUA). A concentração do DNA total extraído foi determinada por fluorimetria (DyNA Quant 2000 Fluorometer, Amersham Biociences, Buckinghamshire, Reino Unido).

3.3 Construção da biblioteca genômica enriquecida

A construção da biblioteca enriquecida foi realizada de acordo com as metodologias desenvolvidos por Billote et al. (1999). O DNA genômico das amostras de cambuci foi digerido com 60 U da enzima de restrição *RsaI* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), 400 mM de espermidina e água Milli-Q para um volume final de 100 μ L. O material foi incubado a 37°C, overnight, para a restrição. Para avaliar a qualidade da restrição, foram aplicados 10 μ L do DNA digerido com 2 μ L de tampão de carregamento (Loading Buffer - LB) em gel 1,2% agarose em tampão 1X SB, o qual foi corado com *SYBRgold* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), após eletroforese (2V.cm⁻¹).

Os fragmentos digeridos foram ligados aos adaptadores específicos *Rsa21* (5'CTCTTGCTTACGCGTGGACTA3') e *Rsa25* (5'TAGTCCACGCGTAAGCAAGCAAGAGCACA 3'). A reação foi conduzida com: 1 μ g do DNA digerido na etapa anterior, tampão Promega – 7,5 mM Tris-HCl (pH 7,8); 2,5 mM de MgCl₂; 2,5 mM de DTT e 2,5 mM de ATP, 0,2 μ M de cada adaptador, 5 U de T4 DNA ligase (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) e água Milli-Q para completar 200 μ L. A reação foi incubada por duas horas a 20°C.

Os fragmentos ligados aos adaptadores foram pré-amplificados utilizando-se o iniciador *Rsa21*. A reação foi realizada adicionando-se 3 μ L do produto da ligação, 0,4 μ M do iniciador, 5 μ L de 10X Taq Buffer; 0,2 mM de dNTP, 3 U de *Taq polymerase* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) num volume final de 50 μ L. Para a amplificação, foram usados os seguintes ciclos: 95°C por 4 min, seguidos de 20 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 1 min, 72°C por 1 min e extensão final de 72°C por 8 min. Uma amostra de 10 μ L da pré-amplificação foi analisada em 1,2%, gel de agarose em tampão SB 1X, corado com *SYBRgold* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), após a eletroforese (2 V.cm⁻¹).

Para o enriquecimento, ocorreu a seleção dos fragmentos que contêm regiões microssatélites. Os fragmentos foram selecionados por hibridização com oligonucleotídeos biotinilados [biotina-(CT)₈ e biotina-(GT)₈], foram recuperados com estreptavidinas ligadas a

contas magnéticas (KIJAS et al., 1994). As contas magnéticas marcadas com estreptavidina necessitam de uma preparação prévia. Desta forma, homogeneizou-se o tubo do produto *Streptavidin Magnesphere Paramagnetic Particle* (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Em seguida, os 600 µL do produto foram magnetizados, por 30 s, e o sobrenadante foi descartado. Após esse processo, foram realizadas três lavagens com 300 µL de 0,5X citrato de sódio salino (SSC). A cada lavagem, descartou-se o sobrenadante, mantendo-se as esferas magnéticas na parede do tubo com um *rack MagneSphere Technology Magnetic Separation Stand* (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Ao final do processo, as esferas foram ressuspensas em 100 µL de 0,5X SSC.

Para o preparo do DNA, adicionaram-se 360 µL de água Milli-Q a 120 µL de DNA da pré-amplificação. Esta solução foi incubada a 95°C por 15 min. Em seguida, adicionaram-se 13 µL de 20X SSC e 6 µL de oligonucleotídeos biotinilados. Os tubos contendo DNA, 20X SSC e oligonucleotídeos foram incubados a temperatura ambiente por 20 min, com agitação suave, a cada 2 min. Os 100 µL de esferas “beads” pré-lavadas foram misturadas com 505 µL da solução de hibridização, sendo incubados por 10 min a temperatura ambiente, agitando-se suavemente a cada 2 min. Após esta etapa, a solução foi magnetizada por 30 s, o sobrenadante foi descartado e as beads foram ressuspensas em 300 µL de 0,1X SSC. Esta etapa foi realizada por três vezes (Lavagem 1; Lavagem 2 e Lavagem 3). Na última etapa, a solução foi ressuspensa em 100 µL de água Milli-Q e magnetizada por 30s. O sobrenadante foi reservado em um tubo 1,5 mL (ELUATO 1) e a solução foi novamente ressuspensa e magnetizada com 150 µL de água Milli-Q (ELUATO 2). Ao final, os fragmentos selecionados foram conservados a -20°C.

Procedeu-se a amplificação dos fragmentos selecionados na etapa anterior (ELUATO 1 e ELUATO 2) utilizando-se o iniciador Rsa21. A reação foi feita adicionando-se 10 µL do produto dos fragmentos selecionados (ELUATO 1 e ELUATO 2), 0,4 µM do iniciador, 10 µL de 10X Tampão *Taq*; 100 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 2 U de *Taq polymerase* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) para volume final de 100 µL. Para a amplificação, foi utilizado o seguinte programa de temperaturas: 95°C por 1 min, seguidos de 25 ciclos de 94°C por 40 s, 60°C por 1 min, 72°C por 1 min e extensão final de 72°C por 5 min. Como controle de qualidade da pré-amplificação foram aplicados 10 µL da mesma com 2 µL de tampão de carregamento (LB) em um gel de 1,2% agarose, preparado em tampão 1X SB, o qual foi corado com *SYBRgold* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) após a eletroforese (2V.cm⁻¹).

3.4 Clonagem dos fragmentos selecionados

Os fragmentos selecionados para construção da biblioteca genômica foram clonados no vetor *pGEM® T Easy Vector Systems* (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) utilizando 5 µL do produto da amplificação, 50 ng do vetor, 10 µL do Tampão 2X, 3 U de T4 DNA ligase em volume final de 20 µL. A reação foi incubada, *overnight*, a 4°C. A transformação bacteriana foi feita em células eletrocompetentes de *E. coli (DH10B)* e plaqueadas em meio seletivo. As colônias brancas foram isoladas e individualizadas em microplacas (96 poços) contendo meio de crescimento seletivo com 8% de glicerol por 24 h a 37°C sendo, posteriormente, estocadas a -80°C. Nesta etapa, foram selecionadas 192 colônias brancas e 2 colônias negativas que foram utilizadas como controle.

3.5 Isolamento do DNA Plasmidial por lise alcalina

O isolamento do DNA plasmidial foi realizado em placa de 96 poços. As etapas deste procedimento incluíram o crescimento bacteriano em meio de cultura líquido *Luria- Bertani* (LB) com a adição de ampicilina (100 mg.L⁻¹), lise alcalina e purificação de filtragem *Millipore* mediante centrifugação. As colônias transformadas foram inoculadas em placa tipo *deep well* com um único toque do replicador em 1,5 mL de meio de cultura LB, acrescido de ampicilina (100 mg.L⁻¹), e incubada por cerca de 22 h a 37°C a 250 rpm. Após o crescimento bacteriano, a microplaca foi centrifugada por 6 min a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a microplaca invertida em papel absorvente por 2 min e, em seguida, acrescentados 240 µL de GET (20% Glicose, 0,5 M EDTA pH 8,0 e 0,5 M Tris HCl pH 7,4) por poço na placa, a qual foi selada, agitada por 2 min para homogeneização das soluções e centrifugada por 9 min a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado, e a microplaca foi invertida em papel absorvente por 2 min. Foram acrescentados mais de 80 µL de GET por poço e, em seguida, a microplaca foi agitada para homogeneizar as soluções. A suspensão foi transferida para outra microplaca de fundo redondo contendo 2,5 µL de 10 mg.mL⁻¹ de RNase por poço. A cada poço foram adicionados 60 µL da solução [0,2 N NaOH, 1% Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)]. Com um adesivo novo, a microplaca foi selada e invertida 30 vezes para homogeneizar as soluções, sendo em seguida incubada por 10 min em temperatura ambiente. Foram adicionados 3 M KOAc por poço, e novamente a placa foi

selada e invertida 30 vezes para homogeneizar as soluções. A microplaca foi incubada em temperatura ambiente por 10 min e depois centrifugada até 4000 rpm. Sem adesivo, a microplaca foi incubada a 90°C por 30 min. A microplaca foi selada, resfriada em gelo por 10 min e centrifugada a 20°C por 6 min a 4000 rpm. Com o auxílio de fitas adesivas, uma placa *Millipore* (MAGV N22) foi fixada no topo de outra placa de fundo “V”. Todo o volume contido na microplaca de fundo redondo foi transferido para a placa *Millipore*. O aparato foi centrifugado a 20°C a 4000 rpm por 6 min. A placa *Millipore* foi removida e ao filtrado resultante na placa fundo “V” foram acrescentados 100 µL de isopropanol. A placa foi homogeneizada, por inversão, por 30 vezes. Em seguida foi centrifugada a 20°C a 4000 rpm, por 45 min. Descartou-se o sobrenadante, invertendo-se a placa, e aos poços foram adicionados 200 µL de etanol 70% gelado. Centrifugou-se a placa a 20°C a 4000 rpm, por 5 min, e, ao final, o sobrenadante foi descartado. Em seguida, a microplaca foi colocada no fluxo laminar por duas horas para secagem do DNA. O DNA foi ressuspensionado em 50 µL de água Milli-Q autoclavada, permanecendo overnight à temperatura ambiente e, em seguida, armazenado a -20°C. A concentração do DNA plasmidial foi estimada por fluorimetria e confirmada em gel 1% agarose corado com *SYBRgold*.

3.6 Sequenciamento dos clones positivos

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o Kit de sequenciamento *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), seguindo as seguintes concentrações para a amplificação dos fragmentos por PCR: 5 µM do iniciador T7, 150 ng de DNA plasmidial, 2 µL de *BigDye® Terminator v1.1 Ready Reaction Mix* e água Milli-Q para um volume final de 10 µL. As amplificações foram realizadas em um termociclador nas seguintes condições: 30 ciclos 95°C por 40 s, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min. Os produtos das amplificações foram purificados adicionando-se 2 µL de Acetato de Sódio/Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) em cada poço, seguido da adição de 60 µL de etanol absoluto; centrifugou-se por 45 min a 4000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi então descartado. Foram adicionados 150 µL de etanol 70% e, em seguida, centrifugou-se por 15 min a 4000 rpm à 4°C. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram secos a 40°C por 10 min.

Foram sequenciados 96 clones na plataforma de sequenciamento automático ABI-3500 *Genetic Analyzer* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), no Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo.

3.7 Desenvolvimento dos iniciadores

As sequências foram analisadas quanto à qualidade dos cromatogramas no conjunto de softwares *Phred*, *Phrap* e *Consed* (<http://www.phrap.org/index.html>). Foram retiradas das sequências as regiões correspondentes ao vetor e ao adaptador, restando apenas a sequência do inserto. Além disso, trechos com baixa qualidade e sequências cujas bases não puderam ser identificadas com segurança (*Phred* < 20) também foram excluídos. Com isso, arquivos tipo FASTA foram obtidos para cada clone, contendo as sequências de interesse e com boa qualidade. Para a identificação das sequências contendo microsatélites e o desenvolvimento dos iniciadores, utilizou-se o programa *SSR Locator* (MAIA et al., 2008).

Para avaliar a qualidade dos iniciadores *forward*, *reverse* quanto à formação de estruturas secundárias como *Hairpin*, *Dimer*, *Cross Dimer* e *Palindrome*, utilizou-se o programa *NetPrimer* com Rating igual ou superior a 90. Para se evitar o desenho de iniciadores redundantes todas as sequências foram alinhadas entre si com o auxílio do programa CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994).

3.8 Validação, amplificação e análise de microsatélites

Foi realizada a síntese química de 16 pares de iniciadores, que foram submetidos ao teste de validação por PCR. Para a realização da PCR foram utilizados 10 ng de DNA para cada reação de 25 µL, contendo 10X Tampão da *Taq* com KCl [500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl (pH 8,8); 0,8% *Nonidet* P40]; 100 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP e dCTP); 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 µM de cada iniciador e 1U de *Taq polymerase* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). As amplificações foram realizadas em termociclador, com a seguinte ciclagem: desnaturação inicial de 95°C por 4 min, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 30 s, temperatura de anelamento variando de 55°C até 59°C por 1 min (temperatura de

anelamento específica para cada reação do teste), 72°C por 1 min e extensão final de 72°C por 8 min.

Os fragmentos amplificados foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2% (3V.cm⁻¹) corado com *SYBRgold* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). O tamanho dos alelos foi estimado comparando-se com o marcador de peso molecular de 100pb (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Aqueles *loci* que apresentaram amplificação perfeita e o tamanho do fragmento amplificado foi próximo ao tamanho esperado foram então analisados em gel de 7% poliacrilamida, revelado com nitrato de prata com intuito de observar a existência de polimorfismos (CRESTE et al., 2001).

As análises dos *loci* de microssatélites foram realizadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (CRESTE et al., 2001). A eletroforese foi feita em cuba vertical *SQ3 sequencing* (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Reino Unido) em placas de vidro tratadas com *PlusOne Bind-Silane* (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) e *PlusOne Repel-Silane* (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA). Para o preparo do gel, foi utilizada a solução de acrilamida 7% (7% acrilamida; 0,8% N,N'-metilenobisacrilamida; 32% formamida; 7 M urea; 10X TBE [1 M Tris-base; 1 M ácido bórico; 20 mM EDTA] e água ultra pura) e para a polimerização do mesmo foi adicionado persulfato de amônio e *TEMED* [N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)]. Após o preparo do gel, o mesmo foi submetido a uma pré corrida a 70W em tampão TBE 1X (89 mM Tris-base; 2 mM EDTA; 89 mM ácido bórico), por 60 minutos, para o aquecimento do gel. As amostras foram preparadas com 10 µL de reação de PCR e 7,5 µL de tampão desnaturante (95% de formamida, 10mM NaOH, xileno cianol 0,05%, azul de bromofenol 0,05% e 20mM EDTA) e desnaturadas a 95°C por 5 minutos e mantidas em gelo até o carregamento no gel. Após o carregamento das amostras no gel, foi feita uma pré-corrida das amostras a 40 W por 10 minutos e, em seguida, a eletroforese ocorreu a 50 W por 2 horas. Utilizou-se marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

A coloração foi realizada com nitrato de prata em cinco etapas de acordo com Creste (2001), com algumas modificações: A fixação foi feita por imersão do gel em solução de etanol 10% e ácido acético 1%, sob agitação por 10 minutos, seguida de uma lavagem com água destilada. A oxidação foi realizada com solução de ácido nítrico 1,5% durante 5 minutos sob lenta agitação; em seguida, o gel foi lavado duas vezes com água destilada. A impregnação com prata foi realizada com a solução de nitrato de prata (AgNO₃) 2% durante 20 minutos sob agitação. Em seguida o gel foi lavado com água destilada duas vezes. O

processo de revelação foi realizado com solução contendo 30 g de Na_2CO_3 e 540 μL de formaldeído (37%) por duas vezes. Após a revelação, o gel foi lavado com água destilada uma vez. O bloqueio da revelação foi feito em solução de ácido acético 5% durante 10 minutos, seguido de uma lavagem com água destilada.

3.9 Análise da diversidade genética

Após a avaliação dos polimorfismos nos géis de poliacrilamida, foram calculados os parâmetros de diversidade genética para os *loci* e para as populações, tais como: número de alelos por *loco*, porcentagem de *loci* polimórficos, heterozigosidade média observada, diversidade gênica (heterozigosidade esperada), índice de fixação e os parâmetros de diversidade de Cocherham, obtidos a partir do programa GDA (*Genetic Data Analysis*) (LEWIS; ZAYKIN, 2000). As frequências alélicas e a distribuição da diversidade genética entre e dentro das populações, analisada pela estatística de Nei (1973), foram estimados com auxílio do programa FSTAT (GOUDET, 2001).

O conteúdo de informação polimórfico (PIC - *polymorphism information content*) proposto por Anderson et al. (1993) foi calculado em função do número de alelos detectados, da sua distribuição e frequência na população estruturada. Os valores do PIC por *loco* são determinados pela expressão:

$$\text{PIC} = 1 - \sum p_i^2$$

Na expressão, p_i é frequência do alelo i na população. O cálculo é baseado no número de alelos detectados por determinado *loco* e a frequência relativa de cada alelo no conjunto dos 145 acessos de cambuci analisados. Análises de agrupamento foram obtidas a partir das distâncias genéticas de Nei (1972), utilizando-se o método aglomerativo UPGMA (*Unweighted pair group method of arithmetic averages*), com auxílio do programa TFPGA (MILLER, 1997).

3.10 Construção da coleção nuclear (*Core collection*)

Com o intuito de construir um banco de germoplasma da espécie de cambuci e preservar toda a diversidade genética das populações estudadas, foi feita a construção de uma coleção nuclear. Essa coleção central (*Core collection*) representa a diversidade máxima de todas as populações avaliadas nesse estudo, com redundância mínima, mantendo o máximo possível da diversidade genética. A coleção nuclear é formada pelo número mínimo de genótipos que representam o máximo da diversidade de todas as populações (EGBADZOR et al., 2014).

Para a construção da coleção nuclear, foi utilizado o programa DARwin 6.0.14 (PERRIER et al., 2003; PERRIER; JACQUEMOUD-COLLET, 2006) para a construção das árvores de diversidade genética. Foram calculadas as dissimilaridades com 10.000 *bootstraps* e transformados em distâncias euclidianas. Após a transformação dos dados, foi aplicado o método *Un-Weighted Neighbor-Joining* para a construção da árvore de diversidade com todos os genótipos. Em seguida, utilizou-se a ferramenta de análise *maximum length sub tree function* para construção da coleção principal (CAMPOY et al., 2016).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração, quantificação e qualificação do DNA genômico

O rendimento da extração do DNA de tecidos foliares de cambuci variou de $14 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ a $75 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$. O DNA extraído estava íntegro e com qualidade para prosseguimento das análises moleculares (Figura 7).

Com o intuito de verificar a integridade e a pureza das amostras de DNA, utilizou-se iniciadores ITS1-18S: CGTAACAAGGTTTCCGTAGG e ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC para amplificar por PCR as regiões ITS (Figura 8).

O sucesso na extração do DNA está diretamente ligado ao armazenamento da amostra, desde a coleta até o momento da extração, sendo que a integridade da molécula do DNA pode ser afetada devido à ação de metabólitos secundários (FERREIRA; GRATAPLAGLIA, 1996). De acordo com Bressan et al. (2014), o etanol pode ser utilizado com grande sucesso na preservação do DNA dos tecidos foliares de espécies tropicais devido à redução ou à inativação de metabólitos secundários que podem contaminar ou degradar o DNA genômico. O uso do etanol também foi importante na preservação do DNA em tecidos foliares de milho (*Zea mays*), arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) e cenoura (*Daucus carota*). A desidratação causada pelo etanol nos tecidos foliares permite a extração do DNA e RNA com alto rendimento e integridade, além de facilitar o transporte e a estocagem das amostras (MURRAY; PITAS, 1996; LINKE et al., 2010).

A qualidade do DNA extraído é afetada pela presença de polissacarídeos e polifenóis que levam à degradação do DNA e inibem as enzimas polimerases, ligases e endonucleases (FIGUEIRA, 2017). Com o intuito de inibir o efeito da oxidação do DNA por compostos fenólicos, integra-se ao tampão de extração polivinilpirrolidona (PVP) e β -mercaptoetanol a fim de garantir baixa contaminação do DNA extraído por polifenóis (WANG et al., 2011). Já a contaminação por polissacarídeos é limitada pela similaridade estrutural com o DNA, o que dificulta no processo de extração do DNA na separação dessas duas moléculas (FIGUEIRA, 2017).

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, o DNA extraído de folhas de cambuci pelo método descrito por Sereno et al. (2006) foi adequado, como também o transporte e o armazenamento do material vegetal em etanol 96% até o momento da extração.

4.2 Desenvolvimento dos iniciadores de microssatélites

Todas as etapas para a construção da biblioteca genômica enriquecida para microssatélites foram realizadas com êxito, de acordo com os controles realizados de cada etapa (Figura 9). O DNA genômico foi digerido com sucesso com a enzima *RsaI*, sem a presença de fragmentos preferencias. A ligação dos adaptadores foi confirmada por PCR na etapa de pré-amplificação, que resulta uma maior quantidade de DNA para etapa de seleção. Também não foram observadas amplificações de fragmentos preferencias, o que poderia resultar em microssatélites redundantes. A redundância pode acontecer devido à presença de clones duplicados pelo próprio procedimento da PCR durante as etapas do desenvolvimento da biblioteca enriquecida (OLIVEIRA, 2006).

Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 0,8% para visualização da qualidade do DNA extraído de folhas de cambuci. População 1 Paraibuna (1 ao 8), B: branco; População 2 Mogi das Cruzes (C1 ao C8), B: branco; População 3 Juquitiba (J1 ao J8), B: branco; População 4 Ribeirão Pires (R1 ao R8), B: branco; População 5 Salesópolis (S1 ao S8), B: branco.

Figura 8. Amplificação da região ITS. População 1 Paraibuna (1 ao 9), B: branco; População 2 Mogi das Cruzes (C1 ao C9), B: branco; População 3 Juquitiba (J1 ao J8), B: branco; População 4 Ribeirão Pires (J1 ao J8) e População 5 Salesópolis (S1 ao S6), B: branco.

Figura 9. Controles realizados durante o desenvolvimento da biblioteca genômica enriquecida em microssatélites para cambuci. 1 – Controle da digestão do DNA genômico em gel de agarose 1,2% eletroforese 2V.cm⁻¹ por 4 horas; 2 – Controle da pré-amplificação dos fragmentos, necessário fazer três repetições (Repetição R1, R2, R3) em gel de agarose 1,2% eletroforese 2V.cm⁻¹ por 3 horas; 3 – Controle da pré-amplificação dos fragmentos selecionados (E1: ELUATO 1; E2: ELUATO 2; B: BRANCO) em gel de agarose 1,2% eletroforese 2V.cm⁻¹ por 3 horas.

A construção da biblioteca enriquecida de microssatélites resultou em 192 clones, dos quais 96 foram sequenciados. Destes, 16 clones apresentaram sequências de microssatélites, o que representa um enriquecimento da biblioteca de 16%, sendo que nenhum destes apresentaram perfis redundantes. Entretanto, as porcentagens de enriquecimento podem sofrer alterações de acordo com o critério utilizado para estabelecer o tamanho mínimo do motivo a ser classificado como microssatélite (BREISSAN, 2011). As 16 sequências que continham

De acordo com a classificação dos microssatélites, os microssatélites perfeitos (quando a sequência repetida não é interrompida por qualquer base que não pertença ao motivo) foram mais frequentes (94%), seguindo de um *loco* (6%) classificado como composto perfeito (quando o *loco* possui duas sequências repetidas distintas adjacentes). Os microssatélites perfeitos são, frequentemente, mais comuns quando comparados com *loci* de microssatélites que possuem interrupções dentro dos motivos (KALIA et al., 2011). De acordo com Weber (1990) e Ellegren et al. (1995), os microssatélites perfeitos são considerados mais polimórficos do que aqueles com interrupções dentro dos motivos. Sendo assim, esses motivos têm preferência no desenvolvimento e síntese dos iniciadores.

Conforme Harr et al. (2000), o processo de *slippage* do DNA, além de promover a geração de novos alelos para os microssatélites, também é importante para promover a remoção das interrupções dos microssatélites imperfeitos. Segundo os autores, a interrupções

dos microssatélites são consideradas como um estado transitório de evolução e não da degeneração dos *loci* de microssatélites.

Em relação à unidade repetitiva, os microssatélites mononucleotídeos foram os mais frequentes (50%), seguidos das classes dinucleotídeos (44%) e trinucleotídeos (6%). Os *loci* de microssatélites dinucleotídeos perfeitos, com maior número de repetições, são ideais para obtenção de marcas altamente informativas pelo fato de apresentarem altos níveis de polimorfismo, devido à ocorrência da taxa de mutação ser maior nos trinucleotídeos e tetranucleotídeos, portanto, são amplamente usados em estudos genéticos (ELLEGREN, 2004). Os *loci* tetranucleotídeos e pentanucleotídeos não foram obtidos na biblioteca genômica para cambuci, pois estes *loci* possuem baixa frequência como demonstrado por Yu et al. (2009) e Ma et al. (2009).

Para o desenvolvimento da biblioteca genômica enriquecida de cambuci foram utilizadas sondas GT e CT; buscando-se obter microssatélites complementares às sondas utilizadas, ou seja, motivos do tipo CA e GA de microssatélites da classe dinonucleotídeos em maior número. Contudo, é comum encontrar a presença de outros tipos de microssatélites (SHI et al., 2007). De acordo com Askenazi et al. (2001), a maior frequência de microssatélites mononucleotídeos pode ser explicado pela baixa afinidade das sondas com as sequências de DNA nos procedimentos de hibridização permitindo que as sondas hibridizassem sem a perfeita complementariedade com as sequências alvos.

Os *loci* de microssatélites mais abundante na biblioteca genômica de cambuci foram os motivos mononucleotídeo T (31%), seguindo dos motivos dinucleotídeos CT ou TC (25%), motivos dinucleotídeos AG ou GA (19%), motivos mononucleotídeos A (13%), motivo trinucleotídeo AGG (6%) e motivo mononucleotídeo composto perfeito T e A (6%). A maior abundância de *loci* dinucleotídeos se deve ao tipo de sonda utilizada no desenvolvimento da biblioteca. De acordo com a revisão feita por Vieira et al. (2016), a frequência das classes de microssatélites é bastante variável em plantas, e os autores relataram que os motivos AG são mais abundantes no genoma de plantas do que os motivos AC. Contudo, algumas espécies, os motivos AC são mais abundantes que os motivos AG (VARSHNEY et al., 2000; BUTCHER et al., 2000).

Os fatores responsáveis pela diferença e abundância dos motivos dos microssatélites entre as várias espécies de plantas ainda não são muito bem esclarecidos (VIEIRA et al., 2016). Entretanto, a escolha das enzimas para a restrição do DNA genômico pode influenciar no número e tipo de repetição dos *loci* de microssatélites encontrados nas bibliotecas genômicas (HAMILTON; FLEISCHER, 1999). A maioria das bibliotecas genômicas

enriquecidas utiliza sondas de dinocleotídeos. Contudo, formações de estrutura secundária podem ocorrer devido ao pareamento interno de bases das sondas (AT)_n, o que dificulta os procedimentos de hibridização com as sequências alvo, fazendo com que as informações sobre a abundância deste tipo de sequência não estejam disponíveis para muitas espécies (OLIVEIRA, 2006).

A partir da biblioteca genômica enriquecida gerada, foi feita a síntese de 16 pares de iniciadores (Tabela 2).

4.3 Validação, amplificação e análise de microssatélites

A análise genética feita por marcadores microssatélites requer a amplificação dos *loci* de microssatélites por PCR utilizando-se os iniciadores complementares às regiões flanqueadoras desses *loci*. Primeiramente, os 16 *loci* de microssatélites obtidos através da biblioteca genômica enriquecida para microssatélites de cambuci foram submetidos à otimização das condições da PCR, e os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,2% para adequação do programa da PCR e da temperatura de anelamento.

Em uma primeira etapa, todos os *loci* foram submetidos à reação de PCR com temperatura de anelamento de 57°C. Essa temperatura foi definida a partir da menor temperatura de anelamento do conjunto dos 16 *loci*, sendo que alguns *loci* apresentaram amplificações perfeitas com o tamanho do produto esperado; já para outros *loci*, foram feitas outras reações de PCR com intervalo de temperatura de anelamento em 2°C, tanto para cima como para baixo da temperatura inicial de 57°C, até que as amplificações fossem perfeitas e com o tamanho esperado do produto amplificado. Para cada *loco*, foi escolhido o programa de reação que rendeu maior quantidade de produto com bandas específicas. Dois *loci* (Cam.ph07 e Cam.ph14) não apresentaram produto de amplificação, sendo assim, foram descartados (Figura 11).

Tabela 2. Relação dos iniciadores que foram sintetizados, incluindo o nome dos iniciadores, a sequência, motivo repetido, temperatura de melting (T_m) e tamanho do fragmento amplificado

<i>Loci</i>	Iniciadores (5' – 3')	Motivo	T _m (°C)	Tamanho (Pb)
Cam.ph01	F: ATGATGATAGGGTGCCAAAGAG R: ACGTCGATTTGTAGGGGATTTA	(A) ₁₃	57°C	271
Cam.ph02	F: GCGTCTCTGGGATTTATATGGA R: AAGGGAAACCGGAAAGTATTGT	(AG) ₇	57°C	343
Cam.ph03	F: ACAGATGTCTCGATGGAATCAC R: CGCCTTTCTTTTATTGGAGAAG	(CT) ₁₃	59°C	251
Cam.ph04	F: GTCGGAGGTTTTAAGGTTGAGA R: CTCTCTCTCTCTCTTGCGATCC	(AGG) ₆	55°C	209
Cam.ph05	F: GAGCTGTTGCTCAGTTCCG R: CTTTGACGAGCTTTCTGGTTCT	(TC) ₉	57°C	288
Cam.ph06	F: CTATCATCGGAGCGAGCTTTAC R: GGACTAACTCTGCTTTTCCCCT	(AG) ₁₃	55°C	256
Cam.ph07	F: TATATGTATCCGCACGAATTGC R: CGCGTGGACTAACTAGGGG	(T) ₁₄	57°C	190
Cam.ph08	F: TTGAGTCCAGGGATTGTCTATG R: ATCTGAACAAGATTCGACTTGC	(T) ₁₂	55°C	127
Cam.ph09	F: GAGGACCAGCAATACAGAGAGG R: TAGAAAACCGAGGAGTTACCGA	(CT) ₁₂	59°C	372
Cam.ph10	F: GACAGAAGCCCCATATTTTCAT R: AAATCTAGTCCCAACCAAGCAA	(T) ₁₀	55°C	302
Cam.ph11	F: TGCTTGGTTGGGACTAGATTTT R: CATAATTCACGAGTGGTCAGGA	(A) ₈	55°C	162
Cam.ph12	F: AACTCGGGAGCTTTTGTGATAC R: AAGAGGACGAGATGTAGGCAG	(T) ₁₃ (A) ₁₁	55°C	310
Cam.ph13	F: ATATGGGGTGCGTTTATTCATC R: ATGAATAAACGCACCCCATATC	(CT) ₉	55°C	213
Cam.ph14	F: ATATGGGGTGCGTTTATTCATC R: CCACATTTGATCTGTAGCAACG	(T) ₁₀	57°C	143
Cam.ph15	F: TAATGGGTATTGCTTTTGAGGG R: ACTCTACTTCTCACCACGGCAT	(T) ₁₁	55°C	342
Cam.ph16	F: AGAGGGGTACTTTTCGGTTTTC R: GCTTCTTGGACAGCATAGGAAT	(GA) ₉	55°C	258

Após a otimização da PCR, os 14 *loci* de microssatélites que apresentaram amplificação foram submetidos ao teste de polimorfismo em gel de 7% poliacrilamida. Para o teste de polimorfismo, as análises foram feitas a partir de 30 genótipos de cambuci escolhidos aleatoriamente entre as populações. Dos 14 *loci* desenvolvidos, 6 (43%) apresentaram perfis polimórficos: Cam.ph03: Cam.ph04: Cam.ph05: Cam.ph06: Cam.ph09: Cam.ph13 (Figura 12). Para os outros 8 *loci* (57%), verificou-se a amplificação de uma única banda (monomórfico). *Loci* microssatélites monomórficos não contém informações sobre a diversidade genética de um organismo.

Figura 11. Gel de agarose 1,2% dos produtos de PCR dos loci de microssatélites em processo de otimização da PCR, utilizou-se dois genótipos de cambuci escolhidos aleatoriamente das populações G1 – genótipo 1; G2 – genótipo 2; B – branco, foi feito um gradiente de temperatura de anelamento com intervalo de 2°C a partir da temperatura inicial de 57°C. Marcador de peso molecular 100 pb

Os marcadores microssatélites têm sido desenvolvidos com sucesso para estudos de diversidade genética de espécies pertencentes à família *Myrtaceae* por diversos autores. Goeke et al. (2017) desenvolveram 24 *loci* de microssatélites para espécie *Kunzea spp.*, Lai et al. (2015) desenvolveram 20 *loci* de microssatélites para espécie *Syzygium samarangense*, Ando et al. (2013) caracterizaram 11 *loci* de microssatélites polimórficos para a espécie *Leptospermum recurvum*. Com relação às espécies frutíferas brasileiras pertencentes a família *Myrtaceae*, marcadores microssatélites já foram desenvolvidos para feijoa (*Acca sellowiana*) (KLABUNDE et al., 2014); pitanga (*Eugenia uniflora*) (Ferreira-Ramos et al., 2008); goiaba (*Psidium guajava*) (RISTERUCCI et al., 2005); cagaita (*Eugenia dysenterica*) (ZUCCHI et al., 2003).

Figura 12. Gel de 7% poliacrilamida corado com nitrato de prata (AgNO_3) abordando os perfis polimórficos dos loci de microssatélites. (A) Cam.ph03: (B) Cam.ph04: (C) Cam.ph05: (D) Cam.ph06: (E) Cam.ph09: (F) Cam.ph13

4.4 Análise da diversidade genética

A elucidação da distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações naturais é de extrema importância para admissão de programas e estratégias para conservação da espécie. A diversidade e os polimorfismos dos *loci* de microssatélites desenvolvidos foram investigados pelas variáveis número médio de alelos por *loco* (A), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e) e o PIC (*Polymorphism Information Content*). O valor de PIC ou a diversidade genética de um *loco* de microssatélite é uma estimativa amplamente utilizada para avaliação do poder discriminatório de um *loco*. Quanto maior a quantidade de informação genética de uma classe de marcadores maior será sua eficiência em detectar polimorfismos entre indivíduos (RAFALSKI et al., 1996).

A partir dos seis *loci* polimórficos, foram detectados 26 alelos, com variação de dois a seis alelos por *loco*. Os *loci* que apresentaram o maior número de alelos foram os Cam.ph03 e Cam.ph06 (seis alelos), e o *loco* que apresentou menor número de alelos foi Cam.ph05 (dois alelos) (Tabela 3).

O valor médio do PIC, conteúdo de informação polimórfica a qual indica a qualidade do marcador em estudos genéticos, foi de 0,499, com uma variação média entre os *loci*, de

0,341 (Cam.ph05) a 0,633 (Cam.ph06) (Tabela 3). Segundo a classificação de PIC de Botstein et al. (1980), todos os marcadores SSR desenvolvidos neste estudo são informativos, sendo que os *loci*: Cam.ph04, Cam.ph05 e Cam.ph13 são considerados *loci* moderadamente informativos ($0,25 < \text{PIC} < 0,5$), e os *loci*: Cam.ph03, Cam.ph06 e Cam.ph09 são considerados *loci* muito informativos ($\text{PIC} > 0,5$). Os valores de PIC também corresponderam aos valores de heterozigosidade esperada (H_e), isto é, quanto maior os valores de PIC, maiores os valores de H_e . Assim, valores de PIC revelaram o poder discriminatório do marcador por considerar o número de alelos por *loco* bem como a frequência relativa desses alelos.

A diversidade genética de Nei (1973) é definida como a probabilidade de dois gametas, tomado ao acaso de uma população, terem alelos diferentes em um determinado loco, a qual corresponde o parâmetro H_e . O parâmetro H_o representa a taxa real de indivíduos heterozigotos na população estudada. A heterozigosidade observada média para os *loci* de microssatélites foi de 0,55 (Tabela 3). Os *loci* Cam.ph03, Cam.ph05, Cam.ph06 e Cam.ph13 apresentaram uma heterozigosidade observada inferior à heterozigosidade esperada, ou seja, indicou uma maior quantidade de indivíduos homozigotos na população para estes *loci*. Já para os *loci* Cam.ph04 e Cam.ph09, a heterozigosidade observada foi superior à heterozigosidade esperada.

Tabela 3. Características dos loci e parâmetros de diversidade genética, número de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e) e PIC (*Polymorphism Information Content*) a partir dos 145 acessos de cambuci

<i>Loco</i>	Tamanho do alelo (pb)	A	H_o	H_e	PIC
Cam.ph03	166 - 191	6	0,50	0,66	0,517
Cam.ph04	197 - 218	4	1,00	0,60	0,490
Cam.ph05	218 - 225	2	0,35	0,46	0,341
Cam.ph06	236 - 256	6	0,52	0,76	0,633
Cam.ph09	295 - 326	4	0,69	0,65	0,564
Cam.ph13	266 - 278	4	0,27	0,69	0,454
Média	-	4,33	0,55	0,64	0,499

Uma vasta gama de estudos moleculares em populações tem como base os marcadores multialélicos, que se designam a mensurar o grau de informação associado aos alelos e/ou *loci* amplificados, proporcionando uma melhor percepção da dinâmica da diversidade genética inter e intrapopulacional. O conhecimento da diversidade ajuda a elucidar processos evolutivos das espécies, auxiliando em ações de conservação genética, domesticação de

espécies e técnicas de melhoramento. Medidas descritivas fornecem uma ideia inicial de como se encontra o polimorfismo genético interpoblacional (FAVORETTO, 2009).

Entre as populações, o número médio de alelos por *loci* variou de 3,33 (Salesópolis) a 4,33 (Mogi das Cruzes) com média de 3,83 alelos por *loco* (Tabela 4). Com exceção da população de Ribeirão Pires que apresentou heterozigosidade observada maior que a heterozigosidade esperada, todas as outras populações apresentaram heterozigosidade observada menor que a heterozigosidade esperada, o que indica uma leve tendência de indivíduos homozigotos nessas populações (Tabela 4). Apesar da heterozigosidade média observada estar ligeiramente inferior a heterozigosidade média esperada, ficou caracterizada a presença de um equilíbrio entre heterozigotos e homozigotos nas populações de cambuci avaliadas, que colabora com o resultado da porcentagem de *loci* polimórficos [$P\ (%) = 0,57$]. O índice de fixação das populações variou de -0,13 a 0,2 sendo que quanto próximos de zero as populações se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg. De acordo com os parâmetros utilizados para avaliar a diversidade genética das populações (Tabela 4), pode-se concluir que as populações estudadas possuem valores de diversidade genética entre 0,53 e 0,61, sendo que a população que apresentou maior diversidade genética foi Mogi das Cruzes e a população com a menor diversidade genética foi Juititaba.

Tabela 4. Parâmetros de diversidade genética, incluindo populações, número de acessos avaliados (n), porcentagem de loci polimórficos (P), número médio de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e) e o índice de fixação (f), a partir de microssatélites avaliados para 5 populações de cambuci

População	Identificação	n	P (%)	A	H_o	H_e	f
1	Paraibuna	52	0,60	4,16	0,53	0,60	0,11
2	Mogi das Cruzes	47	0,61	4,33	0,58	0,61	0,05
3	Juititaba	14	0,53	3,66	0,42	0,53	0,20
4	Ribeirão Pires	22	0,57	3,66	0,65	0,57	-0,13
5	Salesópolis	10	0,55	3,33	0,54	0,55	0,02
Média		29	0,57	3,83	0,54	0,57	0,05

As cinco populações de cambuci avaliadas apresentaram níveis de diversidade genética satisfatórios detectados a partir porcentagem de *loci* polimórficos, número médio de alelos por *loco* e heterozigosidades. Em outras espécies da família *Myrtaceae* foram encontrados resultados semelhantes para análise de diversidade de populações nativas:

Eugenia dysenterica ($H_e = 0,442$, ZUCCHI et al., 2002), *Acca sellowiana* ($H_e = 0,64$) e *Eucalyptus nitens* ($H_e = 0,58$, BYRNE et al., 1996).

4.5 Estrutura genética das populações de cambuci

Com relação aos parâmetros de diversidade genética de Nei (1973), a diversidade genética, a qual é representada pela variabilidade de alelos, para o total de genótipos analisados foi baixa ($H_{T'} = 0,10$) (Tabela 5). A diversidade genética existente entre as populações estudadas é baixa com base nos seguintes parâmetros ($G_{ST'} = 0,19$; $\Theta = 0,09$). Os índices de fixação dentro das populações foram de 0,57 (H_s) e 0,13 (f).

Tabela 5. Diversidade dentro de populações (H_s), diversidade total ($H_{T'}$), proporção da diversidade genética entre populações ($G_{ST'}$), índice de fixação para a espécie (F), divergência genética entre as populações (Θ), índice de fixação dentro da espécie (f), avaliados para seis microssatélites em 5 populações de cambuci

Loco	H_s	$H_{T'}$	$G_{ST'}$	F	Θ	f
Cam.ph03	0,58	0,08	0,14	0,27	0,10	0,25
Cam.ph04	0,58	0,05	0,08	-0,64	0,05	-0,66
Cam.ph05	0,45	0,06	0,12	0,26	0,06	0,23
Cam.ph06	0,69	0,08	0,15	0,32	0,08	0,31
Cam.ph09	0,64	0,10	0,19	0,03	0,10	-0,05
Cam.ph13	0,50	0,24	0,50	0,62	0,17	0,60
Média	0,57	0,10	0,19	0,16	0,09	0,13

De acordo com análise genética total com base nos parâmetros de Nei (1973), constata-se baixa diversidade genética nas populações analisadas ($H_{T'} = 0,10$, Tabela 5). A baixa diversidade genética é confirmada pela variável diversidade genética entre as populações ($G_{ST'} = 0,19$, Tabela 5). O mesmo resultado foi obtido pelo método de Weir e Cockerham (1984), que estima a diferenciação genética entre populações baseando na análise de variância de frequências gênicas ($\Theta = 0,09$, Tabela 5). Contudo, a diversidade dentro de populações ($H_s = 0,57$, Tabela 5) é relativamente alta, quando comparada com as estatísticas de diversidade entre as populações (Figura 13). Resultado parecido foi obtido por Ramos et al. (2007), que avaliaram a diversidade genética de plantas nativas da espécie *Eugenia uniflora*, popularmente conhecida como pitanga, pertencente à mesma família do cambuci, e observaram grande diversidade genética nas populações estudadas e baixa diversidade

genética entre as populações. Bressan (2011) afirmou que espécies arbóreas tropicais, devido à reprodução ocorrer predominantemente por polinização cruzada, tendem a dispersar seus genes a longa distância, conectando populações, contribuindo para baixa diversidade genética entre elas.

Figura 13. Diversidade genética por *loco* polimórfico em porcentagens das cinco populações de cambuci

Segundo Cordeiro (2015), em áreas de ocorrência natural do cambuci, a sincronia de floração pode chegar a até 50%, ou seja, a floração sincronizada pode contribuir para a dispersão dos alelos dentro da população, contribuindo para manutenção da diversidade genética. A dispersão das sementes do gênero *Campomanesia* parece ser predominantemente realizada por mamíferos, especialmente, macacos (GRESSLER et al., 2006). Início da floração do cambuci ocorre no período mais quente e úmido do ano, a qual coincide na época de maior atividade de vertebrados dispersores na Mata Atlântica. Além disso, as sementes também são dispersas em período favorável para a germinação (SCHAIK, VAN et al., 1993; MORELLATO; LEITAO-FILHO, 1996; TABARELLI; PERES, 2002). Esses dados sustentam a hipótese de que há grande diversidade dentro das populações. De acordo com os mesmos autores, o cambuci parece ser uma espécie em que há grande fluxo de alelos entre os indivíduos da população.

A distribuição das frequências alélicas para os seis *loci* de microssatélites comparando os genótipos das cinco populações de cambuci analisadas está demonstrada na Figura 14. As variações nas frequências alélicas, seja por perdas ou por fixação de alelos, podem ser resultado da ação da deriva genética ou da seleção. No caso dos marcadores microssatélites, que são considerados neutros, essas oscilações se desenvolvem através de processos aleatórios. Bajay (2009) afirma que a análise das frequências alélicas é de grande importância, pois, pode refletir melhor os efeitos aleatórios do que a maioria das variáveis no estudo de genética de populações. Segundo Frankel et al. (1996), uma maior equidade nas frequências alélicas numa determinada população seria um indicativo de maior diversidade genética.

Populações que apresentam uma maior diversidade estariam protegidos do efeito da deriva genética do que as populações que têm alelos menos frequentes do que outros, ou seja, estariam mais suscetíveis de serem perdidos (VILELLA, 2004). No presente estudo, comparando-se as populações, foi encontrado um alelo exclusivo na população de Mogi das Cruzes no *loco* SSR_Cambuci_4. De acordo com os resultados deste trabalho (Figura 14), pode-se concluir que frequências alélicas são próximas entre as populações, ou seja, os mesmos alelos são mais frequentes nas cinco populações de cambuci avaliadas. A perda da diversidade genética é prevista com a redução do hábitat, afetando diretamente a evolução da espécie, que resulta na perda dos alelos raros e com o passar da evolução, ocorrerá a perda de mais alelos levando o esgotamento da diversidade genética (LOWE et al., 2005). Levando-se em consideração que neste estudo foi encontrado somente um alelo exclusivo, pode-se inferir que alelos raros já foram perdidos com a deterioração do bioma. Os dados das frequências alélicas colaboram com os dados da estrutura genética que há pouca diversidade entre as populações, ou seja, os mesmos alelos são encontrados nas diferentes populações com frequências aproximadas.

A baixa diversidade entre as populações se deve ao fato do bioma Mata Atlântica ter sido reduzido drasticamente sua área total de floresta e na fragmentação dos habitats, hoje restando apenas 12,5% de sua área segundo dados da SOS Mata Atlântica (2017), e apenas 8,5% dos remanescentes possuem área acima de 100 hectares. A fragmentação do bioma afeta drasticamente o padrão de biodiversidade, não só reduzindo as áreas ecologicamente distintas como também diminuindo a diversidade genética dentro das populações e entre as populações, comprometendo a evolução natural das espécies e reduzindo a adaptação das mesmas às mudanças ambientais (YOUNG & BOYLE, 2000).

Possivelmente, uma grande parte da informação genética da espécie do cambuci já foi perdida com o desmatamento do bioma, e hoje, a diversidade genética existente da espécie

tornou-se restrita nos fragmentos de florestas remanescentes. A conservação dos remanescentes florestais é de extrema importância para que a biodiversidade seja preservada, já que a fragmentação prejudica o fluxo gênico entre os remanescentes, comprometendo o desenvolvimento do processo sucessional e reduzindo a diversidade genética dessas populações (CASCANTE et al., 2002). O cambuci não é uma espécie que está à beira da extinção, mas o estado de conservação da espécie é considerado como vulnerável, devido ao seu habitat ser altamente ameaçado, sendo de grande interesse criar estratégias de conservação da diversidade da espécie.

Uma análise de agrupamento baseada nas distâncias genéticas de Nei (1972), pelo método UPGMA foi realizada para identificar as inter-relações entre as populações avaliadas. O dendrograma obtido mostrou a separação das populações em quatro grupos, tendo como critério de separação dos grupos o valor de *bootstrap*, ou seja, da confiabilidade dos grupos formados acima de 33% (Figura 15). De acordo com o agrupamento feito, as populações mais próximas geneticamente formaram o grupo A, com 61% de confiabilidade, compostas pelas populações: Paraibuna e Mogi das Cruzes. O grupo B, com 31% de confiabilidade, mostrou que a população Ribeirão Pires está próxima geneticamente das populações Paraibuna e Mogi das Cruzes. Já o grupo C foi formado pela população Juquitiba, com 52% de confiabilidade, está próxima geneticamente das populações Paraibuna, Mogi das Cruzes e Ribeirão Pires. De acordo com a distância genética das populações, a população de Salesópolis é a mais distante das demais.

Com base nos valores de distância genética de Nei (1972), as distâncias genéticas das populações são baixas, variando de 0,03 a 0,14. Correlacionando-se distância geográfica com a distância genética, pode-se afirmar que para as populações de Paraibuna, Mogi das Cruzes, Ribeirão Pires e Juquitiba, os resultados correlacionam de modo que, quanto maior a distância geográfica entre as populações maior é a distância genética. Os dados de distância genética e geográfica não se correlacionam com a população de Salesópolis, que está geograficamente próxima das populações de Paraibuna e Mogi das Cruzes, mas está distante geneticamente das mesmas (Figura 15). Pode-se levar em consideração que a distância genética da população de Salesópolis das demais se deve ao fato da pequena quantidade de indivíduos da população, (apenas 10 indivíduos), ou seja, a menor população dentre as demais.

Figura 14. Frequências alélicas dos 6 loci de microssatélites estimados para cada população de cambuci. O eixo Y indica a frequência alélica em % e o eixo X indica o tamanho do alelo em pb.

Figura 15. Dendrograma baseado nas distâncias genéticas de Nei (1972) de cinco populações de cambuci, pelo método UPGMA, utilizando-se seis loci de microsatélites

Com base em todas as análises, pode-se concluir que a diversidade genética dos genótipos de cambuci avaliados pelos seis *loci* de microsatélites desenvolvidos no estudo apresentaram um nível de diversidade genética satisfatório $H_o = 0,54$ (Tabela 4). Em relação à diversidade genética interpopulacional, o resultado encontrado foi uma baixa diversidade genética. A baixa diversidade genética entre as populações pode ser explicada pelo fato de que o cambuci necessita de polinização cruzada combinada com a redução drástica da área do bioma Mata Atlântica pelo desmatamento pode ter contribuído para que a riqueza da diversidade genética se concentrasse nos fragmentos de mata remanescentes, ou seja, dentro das populações.

4.6 Coleção nuclear (*Core collection*)

As coleções de germoplasmas *ex-situ* aumentaram enormemente em número e tamanho nas décadas recentes, graças aos esforços de pesquisadores do mundo todo para conservar os recursos genéticos para a manutenção da diversidade genética de espécies produtoras de alimento (ODONG et al., 2013). As coleções começaram a adquirir grandes proporções, o que acabaram dificultando a caracterização, a avaliação e a utilização do germoplasma conservado (HINTUM, VAN et al., 2000). Com intuito de aumentar a eficiência

das coleções, facilitar criação e caracterização de coleções novas, e a utilização dos bancos de germoplasma, criou-se as chamadas coleções centrais (FRANKEL, 1984). A coleção central representa a diversidade máxima de toda as populações estudadas com número mínimo de indivíduos e de redundância (EGBADZOR et al., 2014). Para a construção da população central neste trabalho, foi utilizado o método sub árvore de comprimento máximo implementado pelo *software* DARwin. Este método procura um subconjunto de genótipos minimizando a redundância entre eles e limitando a perda de diversidade (CAMPOY et al., 2016). A redundância significa que alguns genótipos são muito parecidos e, conseqüentemente, trazem a mesma informação genética.

O procedimento de escolha dos genótipos é baseado na distância genética que é visualizada pela árvore de diversidade genética construída com todos os genótipos. Os genótipos que possuem maiores distâncias genéticas compreendem os genótipos que possuem maior quantidade de caracteres incomuns, ou seja, geneticamente diferentes (BILLOT et al., 2013). Os possíveis genótipos diferentes entre si foram identificados utilizando-se o valor de limite removido (*removed edge value*) fornecido pela árvore genética, valores máximos de comprimento de borda (*length edge*) e o índice de esfericidade (*Sphericity index*) considerando a máxima diversidade genética entre os genótipos selecionados. Campoy et al. (2016) utilizaram como valor de referência 0,008 para o parâmetro de valor de limite removido (*removed edge value*) com intuito de selecionar os indivíduos que possuem a mínima redundância.

A partir dos dados fornecidos pela árvore genética e os valores calculados com a ferramenta de análise *maximum length sub tree function*, foram selecionados 18 genótipos para compor a coleção central (Tabela 6).

Tabela 6. Indivíduos selecionados para compor a população central de acordo com os parâmetros de diversidade genética e mínima redundância calculados pelo programa DARwin

Indivíduo	População	<i>Removed edge value</i>	<i>External edges</i>	<i>Current tree length</i>
8	Paraibuna	0.00000	9.14805	15.99264
12	Paraibuna	0.00000	9.32629	15.99264
14	Paraibuna	0.00000	9.11246	15.99264
18	Paraibuna	0.00000	9.36332	15.99264
27	Paraibuna	0.00000	9.21778	15.99264
42	Paraibuna	0.00000	9.50135	15.99264
56	Mogi das Cruzes	0.00000	9.42409	15.99264
75	Mogi das Cruzes	0.00000	9.30516	15.99264
77	Mogi das Cruzes	0.00000	9.30516	15.99264
101	Juquitiba	0.00000	9.86387	15.99264
106	Juquitiba	0.00000	9.58960	15.99264
109	Juquitiba	0.00000	9.92272	15.99264
112	Juquitiba	0.00000	9.81931	15.99264
119	Ribeirão Pires	0.00000	9.65264	15.99264
120	Ribeirão Pires	0.00000	9.68294	15.99264
141	Salesópolis	0.00000	10.03181	15.99264
145	Salesópolis	0.00000	10.03181	15.99264
146	Salesópolis	0.00000	10.15388	15.99264

De acordo com os dados gerados pelo programa DARwin, a coleção central de cambuci será composta pelos genótipos apresentados na Tabela 6, distribuídos nas 5 populações estudadas. Esses genótipos representam toda a diversidade genética encontrada nos 145 acessos avaliados pelos *loci* de microssatélites desenvolvidos nesse estudo. A construção da coleção central para a espécie de cambuci é de grande importância, já que a

espécie se encontra vulnerável a extinção, pelo fato de que o seu hábitat (bioma Mata Atlântica) é um dos mais ameaçados do planeta. Com essa coleção, será possível proteger a diversidade genética da espécie e a construção de um banco de germoplasma que será útil para o processo de domesticação do cambuci. A construção do banco de germoplasma não irá demandar grandes investimentos, pois, o banco será composto por 18 indivíduos que irão representar toda a diversidade genética das populações estudadas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biblioteca genômica enriquecida com microssatélites permitiu o isolamento de motivos mononucleotídeos, dinucleotídeos e trinucleotídeos de interesse para o desenvolvimento de iniciadores de microssatélites. No total, foram desenvolvidos 16 *loci* de marcadores microssatélites, 6 *loci* apresentaram perfis polimórficos, moderado a altamente informativos segundo o PIC, a qual a qualidade é imprescindível para o uso em estudos de diversidade e estrutura genética, como também poderá ser utilizado futuramente em programas de melhoramento genético da espécie. Os 145 acessos de cambuci foram genotipados com os 6 *loci* de microssatélites permitindo a identificação de 26 alelos, sendo que um alelo foi exclusivo. A diversidade genética encontrada nas populações foi consideravelmente alta, de acordo com o número médio de alelos por *loco*, porcentagem média de *loci* polimórficos e heterozigosidades. A estrutura genética revelou que quase a totalidade da diversidade genética se encontra dentro das populações, e entre as populações a diversidade genética revelou-se baixa, resultando que a diversidade se encontra estruturada principalmente dentro das populações. A coleção principal apresentou reduzido número de acessos, apenas 18, e máxima diversidade genética, a qual futuramente poderá ser utilizada para a construção de um banco de germoplasma.

REFERÊNCIAS

- ADATI, R. T. **Estudo biofarmagnóstico de *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum. Myrtaceae**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. 2001.
- ALEXANDER, L. M.; KIRIGWI, F. M.; FRITZ, A. K.; FELLERS, J. P. Mapping and Quantitative Trait Loci Analysis of Drought Tolerance in a Spring Wheat Population Using Amplified Fragment Length Polymorphism and Diversity Array Technology Markers. **Crop science**, 2012.
- ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. **Conservation and the Genetics of Populations**. p.642, 2007.
- ANDO, S.; KANEKO, S.; ISAGI, Y.; REPIN, R.; KITAYAMA, K. Development of SSR Markers for the Tropical Alpine Tree Species *Leptospermum recurvum* (Myrtaceae) on Mount Kinabalu in Borneo. **Applications in Plant Sciences**, v. 1, n. 9, p. 1200010, 2013.
- ANDRADE, B. A., FONSECA, P. Y., & LEMOS, F. **Cambuci – o fruto, o bairro, a rota: história, cultura, sustentabilidade e gastronomia**. São Paulo, 2011.
- ANDREOTE, A. P. D. **Filosfera da Mata Atlântica: isolamento e sistemática de cianobactérias, bioprospecção e caracterização da comunidade diazotrófica**. Tese de Doutorado. Centro de Energia Nuclear da Agricultura, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2014.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. **Myrtales. Myrtaceae**. Disponível em <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acesso em 3 Fev. 2017.
- APRÍGIO-ASSIS, A. P. **Estudo de padrões de distribuição da diversidade genética e morfológica em *Didelphys aurita*: investigando a biogeografia da floresta Atlântica**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 2011.
- BAJAY, M. M. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização do germoplasma de mamona (*Ricinus communis* L.)**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2009.
- BAJAY, M. M. **Diversidade e estrutura genética de *Piptadenia gonoacantha* (Mart .) J . F . Macbr. em áreas em processo de restauração florestal e remanescentes de Mata Atlântica**. Tese de Doutorado. Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2014.

BAY, M. M. **Desenvolvimento de marcadores microsatélites e caracterização do germoplasma de mamona (*Ricinus communis* L.)**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Genética. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz,” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

BALDWIN, B. G.; SANDERSON, M. J.; PORTER, J. M. The its region of nuclear ribosomal DNA - a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 82, n. 2, p. 247–277, 1995.

BARRET, S.C.H.; KOHN, J.R. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: FALK, D. A.; OLSINGER, K. E. **Genetic and conservation of rare plants**. New York: Oxford University Press, p. 3-30, 1991.

BARROSO, G.M.; PERÓN, V. Myrtaceae. In: LIMA, M.P.M.; GUEDES-BRUNI, R.R. **Aspectos florísticos das espécies vasculares**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v.1, p. 261-301, 1994.

BECKER, J.; VOS, P.; KUIPER, M.; SALAMINI, F.; HEUN, M. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 249, n. 1, p. 65–73, 1995.

BERG, E. E.; HAMRICK, J. L. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 27, n. 3, p. 415–424, 1997.

BILLOT, C.; RAMU, P.; BOUCHET, S.; et al. Massive Sorghum Collection Genotyped with SSR Markers to Enhance Use of Global Genetic Resources. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p.59714, 2013.

BONIN, A.; EHRLICH, D.; MANEL, S. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 18, p. 3737–3758, 2007.

BOONRUANGROD, R.; DESAI, D.; FLUCH, S.; BERENYI, · M; BURG, K. Identification of cytoplasmic ancestor gene-pools of *Musa acuminata* Colla and *Musa balbisiana* Colla and their hybrids by chloroplast and mitochondrial haplotyping. **Theor Appl Genet**, v. 118, p. 43–55, 2008.

BOTREL, M. C. G.; CARVALHO, D. DE. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de jacarandá paulista (*Machaerium villosum* Vog.). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 2, n. 4, p. 621–627, 2004.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, n. 3, p. 314–31, 1980.

BRESSAN, E. A. **Variabilidade genética e estimativa da taxa de cruzamento do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) empregando marcadores moleculares**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente. Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2011.

BRESSAN, E. A.; SCOTTON, D. C.; FERREIRA, R. R. Development of microsatellite primers for *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) and transferability to congeners. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 6, p. 237–239, 2012.

BRESSAN, E.; ROSSI, M.; GERALD, L.; FIGUEIRA, A. Extraction of high-quality DNA from ethanol-preserved tropical plant tissues. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 268, 2014.

BROWN, A.H.D. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, v.52, p.145-57, 1978.

BROWN, K. S.; BROWN, G. G. Habitat alteration and species loss in Brazilian forests. In: WHITMORE, T. C.; SAYER, J. A. (Ed.). **Tropical deforestation and species extinction**. London: Chapman and Hall, cap. 6, p. 119-147, 1992.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A. Y.C.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S; BRONDANI, R.V. Marcadores microssatélites em espécies vegetais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.29, p.46-50, 2003.

BUSCHIAZZO, E. & GEMMELL, N. J. (2006) The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. **Bioessays**, v. 28, p. 1040-1050, 2006.

BUTCHER, P. A.; DECROOCQ, S.; GRAY, Y.; MORAN, G. F. Development, inheritance and cross-species amplification of microsatellite markers from *Acacia mangium*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, n. 8, p. 1282–1290, 2000.

BYRNE, M.; MARQUEZGARCIA, M.; UREN, T.; SMITH, D.; MORAN, G. Conservation and Genetic Diversity of Microsatellite loci in the Genus *Eucalyptus*. **Australian Journal of Botany**, v. 44, n. 3, p. 331, 1996.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. cap. 1, p. 9-78.

CÂMARA, I.G. Brief history of conservation in the Atlantic Forest. In: Galindo-Leal C, Câmara IG (Eds) **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook**. CABS and Island Press, Washington, p. 31–42, 2003.

CAMPOY, J. A.; LERIGOLEUR-BALSEMIN, E.; CHRISTMANN, H. Genetic diversity, linkage disequilibrium, population structure and construction of a core collection of *Prunus avium* L. landraces and bred cultivars. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 49, 2016.

CASTRO A. A. J. F.; MARTINS F.R.; TAMASHIRO J.Y. & SHEPHERD G.J. How rich is the flora of Brazilian Cerrados? **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 86, p.192-225, 1999.

CARDOSO DA SILVA, J. M.; CARDOSO DE SOUSA, M.; CASTELLETTI, C. H. M. Areas of endemism for passerine birds in the Atlantic forest, South America. **Global Ecology and Biogeography** **Global Ecol. Biogeogr.** v. 13, p. 85–92, 2004.

CAROLINA, M.; BOTREL, G.; DULCINÉIA, E.; CARVALHO, D. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de jacarandá paulista (*Machaerium villosum* Vog.). **Revista Brasil. Bot.**, v. 27, n. 4, p. 621–627, 2004.

CARTHEW, S. M. Population genetic structure of *Banksia spinulosa*. **Heredity**, v. 70, n. 6, p. 566–573, 1993.

CARVALHO, V. G. **Diversidade de fungos do solo da Mata Atlântica**. Tese de Doutorado. Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2012.

CASCANTE, A.; QUESADA, M.; LOBO, J. J.; FUCHS, E. A. Effects of Dry Tropical Forest Fragmentation on the Reproductive Success and Genetic Structure of the Tree *Samanea saman*. **Conservation Biology**, v. 16, n. 1, p. 137–147, 2002.

CASTELUCCI, A. C. L. **Avaliação da estabilidade dos compostos bioativos de polpas de frutas nativas submetidas ao processo de irradiação**. Tese de Doutorado. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2015.

CHAMBERS, G. K.; CURTIS, C.; MILLAR, C. D.; HUYNEN, L.; LAMBERT, D. M. DNA fingerprinting in zoology: past, present, future. **Investigative genetics**, v. 5, n. 1, p. 3, 2014.

CHASE, M., KESSELI, R., & BAWA, K. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal of Botany**, New York, v.83 n.1, p. 51-57. 1996.

CHEN, X.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y. G.; MCCOUCH, S. R. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, n. 4, p. 553–567, 1997.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. Boston: Houghton Mifflin, 1968.

COOKE, D. E. L.; DRENTH, A.; DUNCAN, J. M.; WAGELS, G.; BRASIER, C. M. A. Molecular Phylogeny of *Phytophthora* and Related Oomycetes. **Fungal Genetics and Biology**, v. 30, n. 1, p. 17–32, 2000.

CORDEIRO, G. D. **Fenologia reprodutiva, polinização e voláteis florais do cambuci *Campomanesia phaea* (O.Berg) Landrum 1984 - Myrtaceae**. Tese de Doutorado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2015.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic acids research**, v. 16, n. 22, p. 10881–90, 1988.

COSTA, I. R. DA. **Estudos evolutivos em *Myrtaceae*: aspectos citotaxômicos e filogenéticos em *Myrtae*, enfatizando *Psidium* e gêneros relacionados**. Tese de Doutorado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2009.

CRESTE, S.; NETO, A. T.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 4, p. 299–306, 2001.

DELLAQUA, G. FACHINI. **Efeitos na caracterização físico-química e sensorial da polpa de *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum (cambuci) quando submetida a diferentes tratamentos agroindustriais**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente. Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2016.

DIAZ, J.; LA PUENTE, F. DE; AUSTIN, D. F. Notes on economic plants. **Economic Botany**, v. 45, n. 4, p. 521–521, 1991.

DIAZ, V. SANDRI. **Diversidade genética, estrutura genética espacial e fluxo gênico da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) em dois fragmentos florestais na área de entorno do Parque Nacional do Iguaçu**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Recursos Florestais. Departamento de Ciências Florestais. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2013.

EISEN, J. A. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: GOLDSTEIN, D. B.; SCHLÖTTERER, C. (Ed.). **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford: Oxford University Press, p. 34-48, 1999.

EDGER, P. P.; TANG, M.; BIRD, K. A. Secondary structure analyses of the nuclear rRNA internal transcribed spacers and assessment of its phylogenetic utility across the *brassicaceae* (mustards). **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 3–9, 2014.

EDWARDS, A. W. F. G. H. Hardy (1908) and Hardy–Weinberg Equilibrium. **Genetics**, v. 179, n. 3, p. 1143-1150, 2008.

EGBADZOR, K. F.; OFORI, K.; YEBOAH, M. Diversity in 113 cowpea [*Vigna unguiculata* (L) Walp] accessions assessed with 458 SNP markers. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 541, 2014.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 6, p. 435–445, 2004.

ELLSTRAND, N. C.; ELAM, D. R. Population Genetic Consequences of Small Population Size: Implications for Plant Conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 24, n. 1, p. 217–242, 1993.

EPPERSON, B. K. Spatial patterns of genetic variation within plant populations. **Plant population genetics, breeding, and genetic resources.**, p. 229–253, 1990.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47–50, 2005.

FERNANDES, R. C. **Diversidade e estrutura genética em populações naturais de pequi (Caryocar brasiliense Camb.) no norte de Minas Gerais.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2008.

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

FERREIRA, M. E.; MORETZSOHN, M. C.; BUSO, G. S. C. Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 379-420, 2007.

FERREIRA-RAMOS, R.; LABORDA, P. R.; OLIVEIRA SANTOS, M. Genetic analysis of forest species *Eugenia uniflora* L. through of newly developed SSR markers. **Conservation Genetics**, v. 9, n. 5, p. 1281–1285, 2008.

FIGUEIRA, A.V.O.; CASCARDO, J.C.M. Marcadores moleculares no melhoramento. In: DIAS, L.A.S (Ed.). **Melhoramento genético do cacau.** Viçosa: FUNAPE, UFG, p.385-438, 2001.

FINKELDEY, R.; HATTEMER, H. H. **Tropical forest genetics.** Springer: Verlag. p. 265, 2007.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to Conservation Genetics.** Cambridge University Press, New York USA. p. 529, 2010.

FUJIHARA, M.A.; CAVALCANTI, R.; GUIMARÃES, A.; GARLIPP, R. **O valor das florestas**. São Paulo: Terra das Artes Editora, p. 347, 2009.

FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Recursos naturais e meio ambiente: uma visão do Brasil**. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, 1993.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica e ecossistemas associados no período de 1995–2000**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica; INPE, 2001.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. Relatórios e balanço. **Relatório anual de 2015 da SOS Mata Atlântica**. Disponível em: <https://www.sosma.org.br/wp-content/uploads/2016/08/RA_SOSMA_2015-Web.pdf>. Acesso em 24 jan 2017.

GALETTI, M.; FERNANDEZ, J. C. Palm heart harvesting in the Brazilian Atlantic forest: changes in industry structure and the illegal trade. **Journal of Applied Ecology**, v. 35, n. 2, p. 294–301, 1998.

GASCON, C.; WILLIAMSON, G. B.; FONSECA, G. A. B. Receding Forest Edges and Vanishing Reserves. **Science**, v. 288, n. 5470, 2000.

GEBHARDT, C.; RITTER, E.; DEBENER, T. RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 78, n. 1, p. 65–75, 1989.

GEMAYEL, R.; CHO, J.; BOEYNAEMS, S.; VERSTREPEN, K. J. Beyond Junk-Variable Tandem repeats as facilitators of rapid evolution of regulatory and coding sequences. **Genes**, v. 3, p. 461-480, 2012.

GEMTCHÜJNICOV, I. D. **Manual de taxonomia vegetal: plantas de interesse econômico, agrícola, ornamentais e medicinais**. São Paulo: Ceres, p.368, 1976.

GOERCK, J. M. Patterns of rarity in the birds of the Atlantic forest of Brazil. **Conservation Biology**, Cambridge, v. 11, p. 112-118, 1997.

GOEKE, D. F.; MITCHELL, C. M.; LANGE, C.; HOULISTON, G. J. Simple Sequence Repeat Markers for Kânuka (*Kunzea* spp.; *Myrtaceae*) Present in New Zealand. **Applications in Plant Sciences**, v. 5, n. 4, p. 1700008, 2017.

GONÇALVES, A. E. S. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4666-4674, 2010.

GOUDET, J. **FSTAT**: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution. Suíça, 2002. Disponível em: <<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>>. Acesso em: 29 mar. 2017.

GOVAERTS R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B.; LANDRUM, L.; LUCAS, E.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F.; PROENÇA, C.; SOARES-SILVA, L.; WILSON, P. & NICLUGHDHA E. **World Checklist of selected plant families – Myrtaceae**. 2008.

GRAPIN, A. E. Diploid *Musa acuminata* genetic diversity assayed with sequence-tagged microsatellites sites. **Electrophoresis**, v.19, p. 1374-1380, 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, v. 137, n. 4, p. 1121–37, 1994.

GRATTAPAGLIA, D.; VAILLANCOURT, R. E.; SHEPHERD, M.; et al. Progress in *Myrtaceae* genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. **Tree Genetics & Genomes**, v. 8, n. 3, p. 463–508, 2012.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em *Myrtaceae* do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 4, p. 509–530, 2006.

GROVER, A.; MOHAN GUPTA, S.; PANDEY, P.; SINGH, S.; AHMED, Z. Random genomic scans at microsatellite loci for genetic diversity estimation in cold-adapted *Lepidium latifolium*. **Plant Genetic Resources**, v. 10, n. 3, p. 224–231, 2012.

GROVER, A.; RAMESH, B.; SHARMA, P. C. Development of microsatellite markers in potato and their transferability in some members of *Solanaceae*. **Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology**, v. 15, n. 4, p. 343–58, 2009.

GROVER, A.; SHARMA, P. C. Development and use of molecular markers: past and present. **Critical reviews in biotechnology**, v. 8551, n. 2, p. 1–13, 2014.

GUICHOUX, E.; LAGACHE, L.; WAGNER, S.; CHAUMEIL, P.; LÉGER, P.; LEPAIS, O.; LEPOITTEVIN, C.; MALAUSA, T.; REVARDEL, E.; SALIN, F. Current trends in microsatellite genotyping. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 591-611, 2011.

GUILHERME, F. A. G.; MORELLATO, L. P. C.; ASSIS, M. A. Horizontal and vertical tree community structure in a lowland atlantic rain forest, southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 4, p. 725–737, 2004.

HAMILTON, M. B.; FLEISCHER, R. C. Cloned microsatellite repeats differ between 4-base restriction endonucleases. **Journal of Heredity**, v. 90, n. 5, p. 561–563, 1999.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4(1), n. 1, p. 1–9, 2001.

HAMRICK, J. L. Plant Population Genetics and Evolution. **American Journal of Botany**, v. 69, n. 10, p. 1685, 1982.

HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBRIDE, B.; THOMAS, L. (Ed.). **Genetics and conservation**. Menlo Park: The Benjamin/Cummings Publishing Company, p.335-348, 1983.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. **Plant population genetics, breeding, and genetic resources.**, p. 43–63, 1990.

HAMRICK, J.L. GODT, M.J.W. Conservation genetics of endemic plant species. In: AVISE, J.C. HAMRICK, J.L. (Ed.). **Conservation genetics: case histories from nature**. Chapman & Hall, p.281–304, 1996.

HAMRICK, J. Response of forest trees to global environmental changes. **Forest Ecology and Management**, v. 197, n. 1, p. 323–335, 2004.

HANSON, T. R.; BRUNSFELD, S. J.; FINEGAN, B.; WAITS, L. P. Pollen dispersal and genetic structure of the tropical tree *Dipteryx panamensis* in a fragmented Costa Rican landscape. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 8, p. 2060–2073, 2008.

HE, G.; MENG, R.; NEWMAN, M.; et al. Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). **BMC plant biology**, v. 3, p. 1–6, 2003.

HINTUM, T. J. L. VAN; BROWN, A. H. D.; SPILLANE, C.; HODGKIN, T. Core collections of plant genetic resources. **IPGRI Technical Bulletin No. 3. International Plant genetic Resources Institute**, 2000.

HOSHINO, A. A.; BRAVO, J. P.; NOBILE, P. M.; MORELLI, K. A. Microsatellites as Tools for Genetic Diversity Analysis. In: CALISKAN, M. (Ed.). **Genetic Diversity in Microorganisms**. v. 1, p.149-170, 2012.

HOUSELEY, J.; KOTOVIC, K.; HAGE, A. EL; TOLLERVEY, D. Trf4 targets ncRNAs from telomeric and rDNA spacer regions and functions in rDNA copy number control. **The EMBO journal**, v. 26, n. 24, p. 4996–5006, 2007.

INSTITUTOAUA. **Rota do Cambuci.** Disponível em:<
<http://www.institutoaua.org.br/rotadocambuci/>>. Acesso em 25 jan 2017.

JARNE, P. & LAGODA, P.J. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology & Evolution**, v.11, p. 424-429, 1996.

JOHNSON, L. A. S.; BRIGGS, B. G. *Myrtales* and *Myrtaceae*-A Phylogenetic Analysis. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 71, n. 3, p. 700, 1984.

JOLY, C.A., LEITÃO FILHO, H.F. & SILVA, S.M. **The floristic heritage.** In Mata Atlântica - atlantic rain forest (G.I. Câmara, coord.). Ed. Index Ltda. e Fundação S.O.S. Mata Atlântica. São Paulo, 1991.

JORGE, L.I.F. **Caracterização farmacobotânica e microscopia alimentar de seis espécies brasileiras de Myrtaceae Jussieu.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

JONAH, P. M.; BELLO, L. L.; LUCKY, O. Review : The Importance of Molecular Markers in Plant Breeding Programmes. **Global Journal of Science Frontier Research**, v. 11, n. 5, 2011.

KALIA, R. K.; RAI, M. K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, n. 3, p. 309–334, 2011.

KAWASAKI, M.L. Flora da Serra do Cipó: Myrtaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v.1, p. 121-170. São Paulo, 1989.

KAWASAKI, M. L.; LANDRUM, L. R. The Genera of *Myrtaceae* in Brazil: An Illustrated Synoptic Treatment and Identification Keys. **Brittonia**, v. 49, n. 4, p. 508-536, 1997.

KIJAS, J. M.; FOWLER, J. C.; GARBETT, C. A.; THOMAS, M. R. Enrichment of microsatellites from the *citrus* genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. **BioTechniques**, v. 16, n. 4, p. 656–60, 662, 1994.

KLABUNDE, G. H. F.; OLKOSKI, D.; VILPERTE, V.; ZUCCHI, M. I.; NODARI, R. O. Characterization of 10 New Nuclear Microsatellite Markers in *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **Applications in Plant Sciences**, v. 2, n. 6, p. 1400020, 2014.

LANDRUM, L. R. *Campomanesia*. In: **Flora neotrópica**. New York: The New York Botanical Garden, v. 45, p. 7-72, 1986.

LANDRUM, L., & KAWASAKI, M. The genera of Myrtaceae in Brazil. An illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v.49, n.4, p. 508-536, 1997.

LAI, J. M.; TSAI, C. C.; YEN, C. R. Molecular characterization of twenty polymorphic microsatellite markers in the polyploid fruit tree species *Syzygium samarangense* (Myrtaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 13013–13021, 2015.

LEÃO, M. M. **Características do óleo essencial extraído das folhas de *Campomanesia phaea* (O. Ber g.) Landrum (cambuci) obtido em duas microrregiões da Mata Atlântica**. Tese de Doutorado. Departamento de Ciências Florestais, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2012.

LEFEBVRE, V.; CHÈVRE, A. Tools for marking plant disease and pest resistance genes: a review. **Agronomie**, v.15, n. 1, p. 3-19, 1995.

LEGRAND, C. D.; KLEIN, R. M. **Mirtáceas: campomanesia**. In: REIZ, P. R. (Ed.). Flora ilustrada catarinense. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 573-623, 1977.

LEITÃO-FILHO, H.F. Diversity of arboreal species in Atlantic Rainforest. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 66, p. 91-96, 1994.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d15). 2000. Disponível em: <<http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/2000>> Acesso em 31 mar. 2017.

LIM, K. G.; KWOH, C. K.; HSU, L. Y.; WIRAWAN, A. Review of tandem repeat search tools: a systematic approach to evaluating algorithmic performance. **Briefings in Bioinformatics**, v. 14, n. 1, p. 67–81, 2013.

LINKE, B.; SCHRÖDER, K.; ARTER, J. Extraction of nucleic acids from yeast cells and plant tissues using ethanol as medium for sample preservation and cell disruption. **BioTechniques**, v. 49, n. 3, p. 655–657, 2010.

LIU, Z.; FURNIER, G. R. Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 87, n. 1–2, p. 97–105, 1993.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, p.368, 1992.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo *in natura***. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006.

LIU, Z.; FURNIER, G. R. Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 87, n. 1–2, p. 97–105, 1993.

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

LOWE, A. J.; BOSHIER, D.; WARD, M.; BACLES, C. F. E.; NAVARRO, C. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. **Heredity**, v. 95, n. 4, p. 255–273, 2005.

LUCAS, E. J.; HARRIS, S. A.; MAZINE, F. F. Suprageneric Phylogenetics of *Myrteae* , the Generically Richest Tribe in *Myrtaceae*. **Taxon**, v. 56, n. 4, p. 1105–1128, 2007.

MAGGINI, F.; MARROCCO, R.; GELATI, M. T.; DOMINICIS, R. I. Lengths and nucleotide sequences of the internal spacers of nuclear ribosomal DNA in gymnosperms and pteridophytes. **Plant Systematics and Evolution**, v. 213, n. 3–4, p. 199–205, 1998.

MAIA, C. L.; PALMIERI, D. A.; QUEIROZ DE SOUZA, V. Methodology Report SSR Locator: Tool for Simple Sequence Repeat Discovery Integrated with Primer Design and PCR Simulation. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2008, p. 1–9, 2008.

MARCHIORI, J.N.C. & SOBRAL, M. **Dendrologia das angiospermas: *Myrtales***. Santa Maria: Editora da UFSM, p.304, 1997.

MARTINELLI, B.M. **Marcadores moleculares e o melhoramento genético de espécies florestais**. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/bioano01/div39.htm>. Acesso em: 25 Jan. 2017.

MASON, A. S. SSR genotyping. **Methods in Molecular Biology**, v. 1245, p. 77–89, 2015.

MATHIAS, J., & ANDRADE, G. **Cambuci: nativa da mata atlântica, a árvore frutífera é também uma planta ornamental, mas está sob o risco de extinção**. 2013. Disponível em: <http://revistagloborural.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC1649492-4529,00.html>.

MATTHIES, D.; BRÄUER, I.; MAIBOM, W.; TSCHARNTKE, T. Population size and the risk of local extinction: empirical evidence from rare plants. **Oikos**, v. 105, n. 3, p. 481–488, 2004.

MCVAUGH, R. The Genera of American *Myrtaceae* : An Interim Report. **Taxon**, v. 17, n. 4, p. 354–418, 2009.

MEYER, W.; MITCHELL, T. G.; FREEDMAN, E. Z.; VILGALYS, R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 9, p. 2274–80, 1993.

MILLER, M. P. **Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) 1.3**: a windows program

for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Flagstaff, AZ: Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, 1997.

MITTERMEIER, R. A.; MYERS, N.; GIL, P. R. & MITTERMEIER, C. G. **Hotspots: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. Mexico, CEMEX. 1999.

MITTERMEIER, R.A.; GIL, P.R.; HOFFMANN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, J.; MITTERMEIER, C.G.; LAMOURUX, J.; FONSECA, G.A.B. **Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. Washington: Cemex , DC, p. 392, 2005.

MORELLATO, P. C.; LEITAO-FILHO, H. F. Reproductive Phenology of Climbers in a Southeastern Brazilian Forest. **Biotropica**, v. 28, n. 2, p. 180, 1996.

MORI, S. A.; BOOM, B. M.; CARVALINO, A. M. DE; SANTOS, T. S. Ecological Importance of *Myrtaceae* in an Eastern Brazilian Wet Forest. **Source: Biotropica**, v. 15, n. 1, p. 68–70, 1983.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335–350, 1987.

MURRAY, M. G.; PITAS, J. W. Plant DNA from alcohol-preserved samples. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 14, n. 3, p. 261–265, 1996.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B. DA; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 2000.

NAZARENO, A. G.; PEREIRA, R. A. S.; FERES, J. M.; MESTRINER, M. A.; ALZATE-MARIN, A. L. Transferability and characterization of microsatellite markers in two Neotropical *Ficus* species. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 3, p. 568–571, 2009.

NAZARENO, A. G.; ZUCCHI, M. I.; REIS, M. S. Microsatellite markers for *Butia eriospatha* (Arecaceae), a vulnerable palm species from the Atlantic Rainforest of Brazil. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 7, p. e198-200, 2011.

NEI, M. Genetic Distance between Populations. **American Society of Naturalists**, v. 106, n. 949, p. 283–292, 1972.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 12, p. 3321–3, 1973.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University, p. 512, 1987.

ODONG, T. L.; JANSEN, J.; EEUWIJK, F. A. VAN; HINTUM, T. J. L. VAN. Quality of core collections for effective utilisation of genetic resources review, discussion and interpretation. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 2, p. 289–305, 2013.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, M. A. L. Patterns of Floristic Differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the Influence of Climate. **Biotropica**, v. 32, n. 4b, p. 793–810, 2000.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCovsky, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294–307, 2006.

PEAKALL, R.; EBERT, D.; SCOTT, L. J.; MEAGHER, P. F.; OFFORD, C. A. Comparative genetic study confirms exceptionally low genetic variation in the ancient and endangered relictual conifer, *Wollemia nobilis* (Araucariaceae). **Molecular Ecology**, v. 12, n. 9, p. 2331–2343, 2003.

PEANA, A. T.; MARZOCCO S.; POPOLO A.; PINTO A. Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. **Life Sciences**, v. 78, n. 7, p. 719–723, 2006.

PEJIC, I.; AJMONE-MARSAN, P.; MORGANTE, M. Comparative analysis of genetic similarity among *maize* inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, n. 8, p. 1248–1255, 1998.

PHUMICHA, C.; PHUMICHA, T.; WONGKAEW, A. Novel Chloroplast Microsatellite (cpSSR) Markers for Genetic Diversity Assessment of Cultivated and Wild Hevea Rubber. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 33, n. 5, p. 1486–1498, 2015.

POCZAI, P.; HYVÖNEN, J. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: Problems and prospects. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 4, p. 1897–1912, 2010.

QUEIROZ, M. A.; LOPES, M. A. Importância dos recursos genéticos vegetais para o agronegócio. In: NASS, L. L. (Ed.) **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

RAFALSKI, J., MORGANTE, M., POWELL, W., VOGEL, J., & TINGEY, S. **Generation and using DNA markers in plantas**. Analysis of non-mammalian genomes: a practical guide. Academic Press, p. 75–134, 1996.

RAJORA, O.P.; PLUHAR, S.A. Genetic diversity impacts of forest fire, forest harvesting, and alternative reforestation practices in black spruce (*Picea mariana*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, n.7, p. 1203–1212, 2003.

RANKIN-DE-MERONA, J.M.; ACKERLY, D.D. Estudos populacionais de árvores em florestas fragmentadas e as implicações para conservação *in situ* das mesmas na Floresta Tropical da Amazônia Central. **Revista IPEF**, v. 35, p. 47-59, Piracicaba, 1987.

RAUB, F.; HÖFER, H.; SCHEUERMANN, L.; BRANDL, R. The conservation value of secondary forests in the southern Brazilian Mata Atlântica from a spider perspective. **Journal of Arachnology**, v. 42, n. 1, p. 52–73, 2014.

RAUSER, W. E. & ACKERLEY, C. A. Localization of cadmium in granules within differentiating and mature root cells. **Canadian Journal of Botany**, v. 65, n.4, p.643-646, 1987.

REED, D. H. Relationship between Population Size and Fitness. **Conservation Biology**, v. 19, n. 2, p. 563–568, 2005.

REIS, A.S.; FANTINI, A.C.; REIS, M.S.; GERRA, M.P.; DOEBELI, G. Aspectos sobre a conservação de biodiversidade e o manejo da floresta tropical Atlântica. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 4, p. 169-173, 1992.

RENAU-MORATA, B.; NEBAUER, S. G.; SALES, E. Genetic diversity and structure of natural and managed populations of *Cedrus atlantica* (Pinaceae) assessed using random amplified polymorphic DNA. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 5, p. 875–84, 2005.

RIBEIRO, M.C., Metzger, J.P., Martensen, A.C.; Ponzonib, F.J., Hirotac, M.M. **The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation.** *Biological Conservation* v.146(2), p. 1141-1153, 2009.

RISTERUCCI, A. M.; DUVAL, M. F.; ROHDE, W.; BILLOTTE, N. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 4, p. 745–748, 2005.

RODRIGUES, R.R.; JOLY, C.A.; BRITO, M.C.W.; PAESE, A.; METZGER, J.P.; CASATTI, L.; NALON, M.A.; MENEZES, N.; IVANAUSKA, N.M.; BOLZANI, V. & BONONI, V.L.R. **Diretrizes para conservação e restauração da biodiversidade no Estado de São Paulo.** Governo do Estado de São Paulo, São Paulo, p. 238, 2008.

ROMAGNOLO, M.B. **A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Caiuá, Diamante do Norte, PR:** projeto de pesquisa. Maringá: Universidade Federal de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, p. 11, 2009.

SANCHES, M. **Caracterização do fruto de cambuci (*Campomanesia phaea*) e efeito sobre a destanização sobre o potencial funcional in vitro.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 2013.

SANTOS, K. L. DOS; WELTER, L. J.; DANTAS, A. C. DE M. Transference of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Acca sellowiana* and the successful use of this technique in genetic characterization. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 73–79, 2007.

SAVELKOUL, P. H.; AARTS, H. J.; HAAS, J. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3083–91, 1999.

SCHAIK, C. P. VAN; TERBORGH, J. W.; WRIGHT, S. J. The Phenology of Tropical Forests: Adaptive Significance and Consequences for Primary Consumers. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 24, n. 1, p. 353–377, 1993.

SCHIERWATER, B.; ENDER, A. Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 19, p. 4647–8, 1993.

SCHLÖTTERER, C. Genome evolution: Are microsatellites really simple sequences? **Current Biology**, v. 8, p. 132–134, 1998.

SCHLÖTTERER, C. Opinion: The evolution of molecular markers — just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 1, p. 63–69, 2004.

SÉBASTIEN LECLERCQ, E. R. AND P. J. Detecting microsatellites within genomes: significant variation among algorithms. **BMC Bioinformatics**, v. 125, p. 1–18, 2007.

SENAN, S.; KIZHAKAYIL, D.; SASIKUMAR, B.; SHEEJA, T. E. Methods for development of microsatellite markers: an overview. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 6, p. 1–13, 2014.

SERENO, M., VENCovsky, R., ALBUQUERQUE, P., & FIGUEIRA, A. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. **Conservation Genetics** v.7, p. 13–24, 2006.

SHI, Y.; YANG, G.; LIU, Y. Development of 18 polymorphic microsatellite DNA markers of *Laminaria japonica* (Phaeophyceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 4, p. 620–622, 2007.

SIEBERT, P. D.; CHENCHIK, A.; KELLOGG, D. E.; LUKYANOV, K. A.; LUKYANOV, S. A. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. **Nucleic acids research**, v. 23, n. 6, p. 1087–8, 1995.

SILVA J.M.C & CASTELETI C.H. **Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. In: Galindo-Leal C, Camara IG, eds. The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, trends, and outlook. Washington, DC, USA: Center for Applied Biodiversity Science & Island, p. 43–59, 2003.**

SILVA, I. G.; CORRÊIA, A. DE F. K.; BIGARAN, J. T. Characterization study of cambuci fruit [*Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum] and its application in jelly processing. **Boletim Do Centro De Pesquisa De Processamento De Alimentos**, v.30, n.1 p. 83-90, 2012.

SILVA, N.A. RODRIGUES, E. MERCADANTE, A.Z. ROSSO, V.V. **Phenolic Compounds and Carotenoids from Four Fruits Native from the Brazilian Atlantic Forest**. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, V.63 p. 5072–5084, 2014.

SIQUEIRA, M.F. **Análise florística e ordenação de espécies arbóreas da Mata Atlântica através de dados binários**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

SIRACUSA, L. D.; JENKINS, N. A.; COPELAND, N. G. Identification and applications of repetitive probes for gene mapping in the *mouse*. **Genetics**, v. 127, n. 1, p. 169–79, 1991.

SKROCH, P.; NIENHUIS, J. Impact of scoring error and reproducibility RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, n. 6, p. 1086–1091, 1995.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 755, 2001.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINI, F.; LUCAS, E. **Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2017.

SOUZA, S. **Avaliação da variabilidade genética em *Musa spp.* Utilizando marcadores de microssatélites**. Tese de Doutorado. Departamento de Genética. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP, 2002.

SOUZA, A. DE. **Variabilidade dos óleos voláteis de espécies de *Myrtaceae* nativas da Mata Atlântica**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

TABARELLI, M.; CARDOSO DA SILVA, J. M.; GASCON, C. Forest fragmentation, synergisms and the impoverishment of neotropical forests. **Biodiversity and Conservation**, v. 13, n. 7, p. 1419–1425, 2004.

TABARELLI, M.; MANTOVANI, W. A riqueza de espécies arbóreas na floresta Atlântica de encosta no estado de São Paulo (Brasil). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 217–223, 1999.

TABARELLI, M.; PAULO PINTO, L.; MARIA SILVA, J. C.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, 2005.

TABARELLI, M.; PERES, C. A. Abiotic and vertebrate seed dispersal in the Brazilian Atlantic forest: implications for forest regeneration. **Biological Conservation**, v. 106, n. 2, p. 165–176, 2002.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.

TAN, F.; HUANG, Y.; GE, X. Population genetic structure and conservation implications of *Ceriops decandra* in Malay Peninsula and North Australia. **Aquatic Botany**, v. 81, n. 2, p. 175–188, 2005.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

VALLILO, M. I.; GARBELOTTI, M. L.; OLIVEIRA, E. D. E.; CONCEIÇÃO, L.; LAMARDO, A. Características físicas e químicas dos futos do cambucizeiro (*Campomanesia phaea*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 2, p. 241–244, 2005.

VARSHNEY, R. K.; KUMAR, A.; BALYAN, H. S. Characterization of microsatellites and development of chromosome specific STMS markers in bread wheat. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 18, n. 1, p. 5–16, 2000.

VIEIRA, M. L. C.; SANTINI, L.; DINIZ, A. L.; MUNHOZ, C. DE F. Microsatellite markers: What they mean and why they are so useful. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 3, p. 312–328, 2016.

VILLALOBOS, G.; OROZCO-MOSQUEDA, G. E.; LOPEZ-PEREZ, M. Suitability of internal transcribed spacers (ITS) as markers for the population genetic structure of *Blastocystis spp.* **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 461, 2014.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic acids research**, v. 23, n. 21, p. 4407–14, 1995.

VUYLSTEKE, M.; MANK, R.; ANTONISE, R.. Two high-density AFLP® linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, n. 6, p. 921–935, 1999.

WANG, T. Y.; WANG, L.; ZHANG, J. H.; DONG, W. H. A simplified universal genomic

DNA extraction protocol suitable for PCR. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 10, n. 1, p. 519–525, 2011.

WARDILL, T. J.; SCOTT, K. D.; GRAHAM, G. C.; ZALUCKI, M. P. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Acacia nilotica* ssp. *indica* (Mimosaceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 361–363, 2004.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant Class of Human DNA Polymorphisms Which Can Be Typed Using the Polymerase Chain Reaction. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 44, p. 388–396, 1989.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic acids research**, v. 18, n. 22, p. 6531–5, 1990.

WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; GADEK, P. A.; QUINN, C. J. *Myrtaceae* revisited: A reassessment of infrafamilial groups. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 11, p. 2013–2025, 2001.

WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; HESLEWOOD, M. M.; QUINN, C. J. Relationships within *Myrtaceae* sensu lato based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, n. 1, p. 3–19, 2005.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: INNIS, M.A. et al. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press, p. 315–322, 1990.

WU, K.-S.; TANKSLEY, S. D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Mol. Gen. Genet.**, v. 241, p. 225–235, 1993.

XU, J.; LIU, L.; XU, Y. Development and Characterization of Simple Sequence Repeat Markers Providing Genome-Wide Coverage and High Resolution in Maize. **DNA Research**, v. 20, n. 5, p. 497–509, 2013.

YEEH, Y.; KANG, S. S.; CHUNG, M. G. Evaluations of the natural monument populations of *Camellia japonica* (Theaceae) in Korea based on allozyme studies. **Bull. Acad. Sin.**, v. 37, p. 141–146, 1996.

ZANETTINI, M.H.B.; CAVALLI, S.S. Variabilidade genética em função do modo de reprodução. In: FREITAS, L.B.; BERED, F. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre, RS: UFRGS, p.177–187, 2003.

ZHANG, L.; YUAN, D.; YU, S. Preference of simple sequence repeats in coding and non-coding regions of *Arabidopsis thaliana*. **Bioinformatics**, v. 20, n. 7, p. 1081–1086, 2004.

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.

ZIMBACK, L.; SEIZO, E.; PAULO, M.. Genetic structure of *Trichilia pallida* Swartz (*Meliaceae*) populations by RAPD markers. **Scientia Forestalis**, v. 65, p. 114–119, 2004.

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. P. V.; PINHEIRO, J. B.; BRONDANI, C.; VENCovsky, R. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (*Myrtaceae* family). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, n. 4, p. 512–513, 2002.

ZUCCHI, M.; BRONDANI, R. P. V.; PINHEIRO, J. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 449–457, 2003.